

HUMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN



Titel der Arbeit:

**Experimentelle Untersuchungen an Fledermäusen als
potenzielles Reservoir von Ebolaviren**

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Biologe

Marcel Bokelmann

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. Christian Ulrichs

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. Detlev Krüger
2. PD Dr. Anne Balkema-Buschmann
3. Dr. Andreas Kurth

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Februar 2021

Die für diese Dissertation notwendigen Experimente wurden im S2- und S4-Labor am Zentrum für Biologische Gefahren und Spezielle Pathogene des Robert Koch-Instituts in Berlin und am LANADA (Laboratoire National d'Appui au Développement) an der Elfenbeinküste durchgeführt.

Betreut wurde die Arbeit von Prof. Dr. med. Detlev H. Krüger und Dr. Andreas Kurth.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ZUSAMMENFASSUNG	VI
SUMMARY	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Ebolaviren	1
1.1.1 Die Familie der <i>Filoviridae</i> : Aufbau der Virionen und Vertreter	1
1.1.2 Ausbrüche	3
1.1.3 Arbeitssicherheit	3
1.1.4 Transmission	3
1.1.5 Virale Dissemination und klinische Manifestation beim Menschen	4
1.1.6 Viruseintritt in die Wirtszelle und die Schlüsselrolle von NPC1	5
1.2 Viruspersistenz und immunprivilegierte Organe	7
1.3 Flughunde und Fledermäuse	10
1.3.1 Phylogenie, Verbreitung und Lebensweise von <i>M. condylurus</i>	11
1.3.2 Biologische Eigenschaften von Chiroptera als Virusreservoir	13
1.3.3 Thermoregulation von <i>M. condylurus</i>	14
1.3.4 Eintritt von Filoviren in Chiroptera-Zellen	17
1.3.5 Chiroptera als Reservoirwirte verschiedener Viren	18
1.3.6 <i>M. condylurus</i> als potenzielles Reservoir von Ebolaviren	21
1.4 Zielsetzung	22
2 MATERIAL	24
2.1 Chemikalien, Medien und Reagenzien	24
2.2 Puffer und Zellkulturmedien	25
2.3 Kommerzielle Kits	26

2.4	Primer	26
2.5	Antikörper.....	27
2.6	Zellkulturen	27
2.7	Virusstämme	28
2.8	Geräte	28
2.9	Verbrauchsmaterial	29
2.10	Software.....	31
3	METHODEN.....	32
3.1	Fangen von Fledermäusen an der Elfenbeinküste	32
3.2	Langzeithaltung und Beprobung von Fledermäusen an der Elfenbeinküste	32
3.3	Zellbiologische Methoden	34
3.3.1	Kultivierung von Zellen	34
3.3.2	Bestimmung der Zellzahl.....	35
3.3.3	Etablierung von Primärzellkulturen	35
3.3.4	Einfrieren von Zellen	36
3.3.5	Immortalisierung durch lentivirale Transduktion von SV40T	37
3.3.6	Klonierung von Zellen	37
3.3.7	Konfokale Mikroskopie	37
3.3.8	Nachweis von EBOV-GFP-infizierten Zellen.....	40
3.3.9	Durchflusszytometrie zur Charakterisierung der NPC1-Rezeptor-Expressionslevel	40
3.3.10	Infektion von Zellen mit Filoviren im S4-Labor	41
3.3.11	Virustitration	41
3.4	Molekularbiologische Methoden.....	42
3.4.1	Bestätigung der Fledermausspezies.....	42
3.4.2	RNA-Extraktion nach Infektion	45
3.4.3	Reverse Transkriptase quantitative Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR).....	45
3.4.4	Extraktion und Anreicherung viraler RNAs aus Fledermausproben	46
3.4.5	Next Generation Sequencing (NGS).....	50
3.5	Probenauswahl für NGS und metagenomische Analyse	51

3.6	Bioinformatische Methoden	51
3.6.1	Metagenomische Analyse von Oralabstrich- und Urinproben	51
3.6.2	<i>M. condylurus</i> NPC1-Sequenz.....	52
3.7	Statistik.....	52
4	ERGEBNISSE.....	53
4.1	Langzeithaltung und Virom von <i>M. condylurus</i>	53
4.1.1	Langzeithaltung mit Beprobung der Fledermäuse	53
4.1.2	Positivkontrollen für die metagenomische Analyse.....	54
4.1.3	Metagenomische Analyse von Proben von <i>M. condylurus</i>	55
4.2	Untersuchung der NPC1-Rezeptor-Expression in Fledermaus-Primärzellkulturen und -Zelllinien	59
4.2.1	Etablierung von Primärzellkulturen von <i>M. condylurus</i> und <i>N. noctula</i>	59
4.2.2	Immortalisierung durch lentivirale Transduktion von SV40T und Klonierung	62
4.2.3	Auswahl des Antikörpers für den Nachweis von <i>M. condylurus</i> NPC1.....	63
4.2.4	Multiple <i>Alignments</i> von Fledermaus-NPC1-Partialsequenzen	63
4.2.5	Charakterisierung der NPC1-Rezeptor-Expression	63
4.3	Infektion von Fledermauszellkulturen mit Filoviren	70
4.3.1	EBOV-Replikationskinetik in Zellkulturen.....	71
4.3.2	Cytopathischer Effekt bei EBOV-infizierten Zellkulturen.....	74
4.3.3	Einfluss der Filovirusinfektion auf das NPC1-Rezeptor-Expressionslevel.....	76
4.4	Persistierende EBOV-Infektionen in Zellkulturen	78
4.4.1	Langzeitkultivierung und EBOV-Replikationskinetik	78
4.4.2	EBOV-GFP-Infektion von ausgewählten Primärzellkulturen.....	80
4.4.3	Konfokale Mikroskopie von persistent infizierten Lungenzellen	82
4.5	Einfluss von Temperatur auf Zellkulturen und Filovirusreplikation	84
4.5.1	Ermittlung relevanter Umgebungstemperaturen von <i>M. condylurus</i> an der Elfenbeinküste.....	84
4.5.2	Temperaturabhängiges Wachstum und Viabilität von Zellkulturen.....	85
4.5.3	Langzeitadaptation von <i>M. condylurus</i> -Zellen an 27°C und Veränderungen des NPC1-Rezeptor-Expressionlevels.....	87
4.5.4	Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Virusreplikation von EBOV und MARV	88

5	DISKUSSION	93
5.1	Langzeithaltung und metagenomische Analyse von Proben von <i>M. condylurus</i>	93
5.2	Primärzellkulturen von <i>M. condylurus</i> und NPC1-Rezeptor-Expressionslevel	97
5.2.1	Primärzellen mit niedriger Passagenzahl	97
5.2.2	Spontane Immortalisierungen	98
5.2.3	NPC1-Rezeptor in <i>M. condylurus</i> und anderen Spezies	99
5.3	Replikation von EBOV in Zellen von <i>M. condylurus</i>	101
5.3.1	Korrelation zwischen NPC1-Rezeptor-Expressionslevel und EBOV-Replikationsrate	101
5.3.2	Veränderungen der EBOV-Replikationsrate in immortalisierten Zellen	105
5.3.3	Virusreplikation ohne Zellzerstörung in Primärzellen von <i>M. condylurus</i>	106
5.3.4	Stark erhöhte NPC1-Rezeptor-Expressionslevel nach Infektion mit Filoviren	108
5.4	Toleranz und Persistenz von EBOV in Zellen von <i>M. condylurus</i>	109
5.5	Einfluss hoher und niedriger Temperaturen auf Wirtszellen und Virusreplikation	113
5.5.1	Temperatortoleranz von <i>M. condylurus</i> -Zellen	113
5.5.2	Replikation von EBOV bei 42°C	115
5.5.3	Replikation von EBOV bei 27°C	116
5.5.4	Wechselnde Körpertemperatur als potenzieller Schlüsselfaktor für Toleranz gegenüber Ebolaviren	117
5.6	Relevanz der Ergebnisse	119
5.7	Ausblick	121
6	VERZEICHNISSE	123
6.1	Abkürzungsverzeichnis	123
6.2	Abbildungsverzeichnis	125
6.3	Tabellenverzeichnis	127
6.4	Literaturverzeichnis	128

7	ANHANG	162
7.1	Abbildungen.....	162
7.2	Veröffentlichungen	180
7.3	Vorträge	181
7.4	Preise und Stipendium.....	181
7.5	Konferenzen	181
8	DANKSAGUNG	182
9	EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	184

Zusammenfassung

Wenige Studien haben erste Hinweise darauf geliefert, dass die insektivore Fledermausart *Mops condylurus* ein natürliches Reservoir von Ebolaviren sein könnte. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden weitere Hinweise gesucht, um die Bedeutung dieser Fledermausart als Reservoirwirt für Ebolaviren besser beurteilen zu können. Dafür wurden die Expressionslevel des Membranproteins Niemann-Pick C1 (NPC1), welches essentiell für den Eintritt von Ebolaviren in ihre Wirtszellen ist, *in vitro* durch konfokale Mikroskopie und Durchflusszytometrie charakterisiert. In dieser Arbeit generierte Primärzellkulturen aus 12 verschiedenen Organen von *M. condylurus* zeigten für die meisten Primärzellen deutlich niedrigere Expressionslevel als Kontrollzellen von Mensch, Affe oder einer europäischen Fledermaus. Die untersuchte Replikationskinetik von Ebola virus (EBOV) zeigte in allen Primärzellen von *M. condylurus* niedrigere Replikationsraten, die meistens mit den niedrigen NPC1-Rezeptor-Expressionsleveln korrelierten. Geringere Mengen von NPC1 könnten *in vivo* zur Virusreplikation auf niedrigerem Niveau beitragen. Desweiteren zeigten alle Primärzellen von *M. condylurus* eine hohe Toleranz gegenüber EBOV ohne Zelltot. Eine beobachtete Persistenz in Lungenprimärzellen könnte die intrinsische Fähigkeit widerspiegeln, dass Ebolaviren auch *in vivo* in dieser Fledermausart persistieren könnten. Mit den geringeren NPC1-Rezeptor-Expressionsleveln, der geringeren Virusreplikation, der hohen Toleranz gegenüber EBOV und der Etablierung von persistenten Infektionen in Primärzellen von *M. condylurus* wurden *in vitro* zusätzliche Hinweise gewonnen, die die Wahrscheinlichkeit dieser Fledermausspezies als ein mögliches natürliches Reservoir von Ebolaviren erhöht. Ergebnisse von zusätzlichen Temperaturversuchen lassen vermuten, dass die Heterothermie der Fledermäuse einen Schlüsselfaktor für die Toleranz von Ebolaviren *in vivo* darstellen und darüber hinaus an der Balance zwischen Viruskontrolle und Virusvermehrung beteiligt sein könnte.

Summary

Few studies provide first evidence that *Mops condylurus*, an insectivorous microbat, could be a natural reservoir for ebolaviruses. The aim of this thesis was to investigate indicators to determine the potential role of this bat species in the ecology of ebolaviruses. Therefore, the expression levels of the membrane protein Niemann-Pick C1 (NPC1), essential for the entry of ebolaviruses into their host cells, were characterized *in vitro* by confocal microscopy and flow cytometry. Our generated primary cell cultures from 12 different organs from *M. condylurus* showed significantly lower expression levels in most primary cells compared to control cells from human, monkey or a European bat. In most cases, lower Ebola virus (EBOV) replication rates in primary cells from *M. condylurus*, determined by RT-qPCR, correlated to lower NPC1 receptor expression levels. Low NPC1 receptor expression levels may contribute to decreased virus replication rates also *in vivo*. Additionally, all primary cells were highly tolerant to EBOV infections without cell death. The observed establishment of persistent EBOV infections in lung primary cells from *M. condylurus* may reflect the intrinsic ability to persist *in vivo* in this bat species. With lower NPC1 receptor expression levels, lower virus replication rates, high tolerance to EBOV infections and establishment of persistent infections in primary cells from *M. condylurus*, the *in vitro* experiments provided further evidence that this bat species is a potential reservoir of ebolaviruses. Results from additional temperature experiments suggest, that heterothermy of *M. condylurus* could be a key factor for tolerance to EBOV infections *in vivo* and be involved in balancing the level of virus replication.

1 Einleitung

1.1 Ebolaviren

1.1.1 Die Familie der *Filoviridae*: Aufbau der Virionen und Vertreter

In der Ordnung Mononegavirales gibt es verschiedene Virusfamilien mit diversen humanpathogenen Vertretern [1], wie die *Rhabdoviridae* mit dem Rabiesvirus (RABV), die *Paramyxoviridae* mit dem Hendravirus (HeV) und Nipahvirus (NiV) und die *Filoviridae*, die mit den Ebolaviren im Zentrum dieser Arbeit stehen.

Die Viruspartikel der *Filoviridae* sind umhüllt und können unterschiedlich geformt sein [2]: Typisch sind lange filamentöse Strukturen (Abbildung 1A).

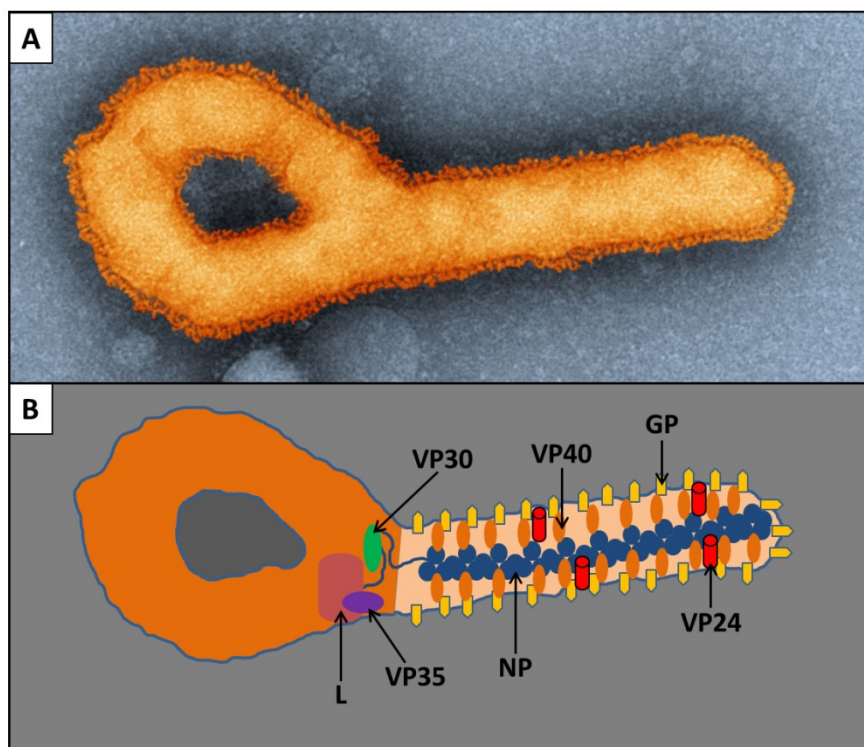


Abbildung 1: Aufbau eines Ebola-Virus-Partikels

A: Elektronenmikroskopische Aufnahme [3]; B: schematischer Aufbau des Viruspartikels mit Virusproteinen.

Das Genom besteht aus einer linearen, nicht-segmentierten RNA in Negativstrangorientierung mit einer Größe von 15-19 kb. Die Virionen enthalten

einen Ribonukleoproteinkomplex (RNP), bestehend aus der viralen RNA, dem Nukleoprotein NP, dem Polymerase-Cofaktor VP35, dem Transkriptionsaktivator VP30, der RNA-abhängigen RNA-Polymerase L und VP24 (Abbildung 1B). Eine wichtige Funktion des RNP-assoziierten Proteins VP24 ist die Inhibition der Interferon-Antwort des Wirtes [4]. Das Matrixprotein VP40 übernimmt wichtige Funktionen beim Zusammenbau (*Assembly*) und der Knospung (*Budding*) der Viruspartikel. Das Glykoprotein GP befindet sich in der Hüllmembran und ist für die Anheftung (*Attachment*) und den Eintritt in die Wirtszellen essentiell.

Innerhalb der Familie der *Filoviridae* werden die Gattungen *Ebolavirus* und *Marburgvirus* unterschieden [5]. Nach der Entdeckung des Lloio virus (LLOV) in insektivoren Fledermäusen wurde desweiteren die Gattung *Cuevavirus* [6] zur Taxonomie hinzugefügt und nach der kürzlichen Entdeckung des Mënglà virus (MLAV) in Flughunden die Gattung *Dianlovirus* vorgeschlagen [7]. Es werden zwei verschiedene Marburgviren unterschieden [8]: Das in dieser Arbeit verwendete Marburg virus (MARV) und das erst 1996 beschriebene Ravn virus (RAVV) [9]. Beide Erreger verursachen beim Menschen ein virales hämorrhagisches Fieber mit Sterblichkeitsraten von 24-88 % [10] - die Marburgviruserkrankung (*Marburg virus disease* – MVD) - und sind klinisch nicht unterscheidbar [11].

Bisher konnten sechs Spezies von Ebolaviren identifiziert werden [5, 12]: Ebola virus (EBOV; Spezies *Zaire ebolavirus*), Sudan virus (SUDV; Spezies *Sudan ebolavirus*), Taï Forest virus (TAFV; Spezies *Taï Forest ebolavirus*), Bundibugyo virus (BDBV; Spezies *Bundibugyo ebolavirus*), Reston virus (RESTV; Spezies *Reston ebolavirus*) und das erst kürzlich entdeckte Bombali virus (BOMV; Spezies *Bombali ebolavirus*) [13]. Vier dieser Virusvertreter (EBOV, SUDV, TAFV und BDBV) verursachen schwere hämorrhagische Fieber beim Menschen mit Sterblichkeitsraten von bis zu 90 %, wobei das Krankheitsbild als Ebolaviruserkrankung (*Ebola virus disease* – EVD) bezeichnet wird [5, 12].

1.1.2 Ausbrüche

Seit dem ersten beschriebenen Ausbruch im Jahr 1976 in der Nähe des Flusses Ebola in der heutigen Demokratischen Republik Kongo (DR Kongo) sind Ebolaviren periodisch immer wieder aus ihrem natürlichen Reservoir emergiert und haben in verschiedenen afrikanischen Ländern bisher 29 Ausbrüche verursacht [14]. In den Jahren 2014-2016 kam es in Westafrika (Guinea, Liberia und Sierra Leone), verursacht durch EBOV, mit mehr als 28.600 Fällen und 11.300 Toten zum bisher größten Ausbruch. Der zweitgrößte Ebolavirus-Ausbruch in der Geschichte wurde von 2018-2020 im Osten der DR Kongo durch dasselbe Virus verursacht und führte zu mehr als 3400 Fällen und 2200 Toten [15-17]. Im Juni 2020 ist es in einer anderen Provinz im Westen der DR Kongo zu einem neuen Ausbruch verursacht durch EBOV gekommen, der derzeit noch andauert [14, 18].

1.1.3 Arbeitssicherheit

Aufgrund der hohen Letalität, der bekannten Mensch-zu-Mensch-Übertragung und des Mangels an zugelassenen Impfstoffen und Therapeutika [19] wurden Ebolaviren als Pathogene der Risikogruppe 4 [20] bzw. als Agentien der Kategorie A [21] eingestuft, deren Handhabung ausschließlich in einem Hochsicherheitslabor (S4) erlaubt ist. Bisher gibt es in Deutschland keinen zugelassenen Impfstoff gegen Ebola. Mit Sondergenehmigung der WHO wird ein experimenteller Impfstoff in Ausbruchsgebieten angewendet.

1.1.4 Transmission

Die Art der primären Transmission von Ebolaviren vom natürlichen Reservoir auf andere Tiere und den Menschen ist bisher unbekannt [22]. Vermutlich durch direkten Kontakt mit Organen, Blut, Sekreten oder anderen Körperflüssigkeiten von Zwischenwirten, wie Affen, waldbewohnenden Antilopen oder Stachelschweinen, gelangt das Virus in die menschliche Population [12]. Das Virus kann dann durch direkten Kontakt mit Blut, Fäzes oder Erbrochenem einer infizierten Person durch Risse in der Haut und über die Schleimhäute,

aber auch durch Nadelstichverletzungen [23] oder durch Muttermilch [24] und Samenflüssigkeit [25] übertragen werden.

1.1.5 Virale Dissemination und klinische Manifestation beim Menschen

Bei Menschen und nichtmenschlichen Primaten (*non-human primates*, NHPs) führt die systemische Dissemination des Virus in viele Zelltypen und die starke Virusreplikation zu einer komplexen Pathogenese, bei der Immunsuppression, Immunüberaktivierungen, gestörte Koagulation und Gewebeschädigungen durch virale oder Wirtseffektoren beobachtet werden [22]. Ebolaviren replizieren beispielsweise in Monozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen (*dendritic cells*, DCs), Endothelzellen, Fibroblasten, Hepatozyten und Nebennierenzellen [26, 27]. Makrophagen und DCs sind die frühen Replikationsorte des Virus [23, 27]. Die massive Bildung von proinflammatorischen Cytokinen und Chemokinen („*cytokine storm*“) durch diese Zellen führt dazu, dass mehr Makrophagen und DCs, aber auch Neutrophile und Eosinophile Granulozyten in die infizierten Gewebe rekrutiert werden, wodurch mehr Zielzellen für die Virusvermehrung zur Verfügung stehen [26, 27]. Über Monozyten, Makrophagen und DCs gelangen die Viren vom initialen Ort der Infektion über die Lymphbahnen in die regionalen Lymphknoten und über die Blutbahn zu Milz und Leber [23], wo massive Virusreplikation stattfindet [27]. Auch die weitere systemische Ausbreitung der Viren im Körper von der Milz und den Lymphknoten zu anderen Geweben erfolgt u.a. über diese Zellen [26].

Die Inkubationszeit beträgt zwei bis 21 Tage [12, 28]. Das Endstadium der Erkrankung ist charakterisiert durch verbreitete intravaskuläre Gerinnung, Hypotonie und Hämorrhagien u.a. durch die Entzündung der Leber, Gewebeerstörung und Zerstörung der Endothelien [29]. Bei tödlichen Verläufen tritt der Tod 6-16 Tage [23] nach Beginn der Symptome als Ergebnis von Multiorganversagen und einem schweren septischen Schock ein [23, 29].

1.1.6 Viruseintritt in die Wirtszelle und die Schlüsselrolle von NPC1

Eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen ist empfänglich für Infektionen durch EBOV und andere Filoviren und kann produktiv infiziert werden (pantropen Viren) [30-32]. Unterschiedliche Wirtszellfaktoren können das *Attachment* von Filoviren an ihre Wirtszellen vermitteln, wobei je nach Zelltyp beispielsweise C-Typ-Lektine oder auch TIM-1 (*T-cell immunoglobulin and mucin domain 1*) am *Attachment*-Prozess beteiligt sein können [32]. C-Typ-Lektine interagieren mit N- und O-verknüpften Glykanen auf EBOV-GP und sind auf einer Vielzahl von Zellen vorhanden [30, 33-40]. TIM-1 interagiert demgegenüber mit Phosphatidylserin in der Virushülle [41-43] und wird beispielsweise auf Schleimhautepithelzellen von Trachea, Cornea und Konjunktiva exprimiert [41]. Auch einige Mitglieder der TYRO3-Rezeptor-Tyrosinkinasefamilie (Axl, TYRO3 und Mer) [44-47] als auch $\alpha_5\beta_1$ -Integrin [48] scheinen in einigen Zellen am *Entry*-Prozess beteiligt zu sein [35].

Die eigentliche Aufnahme der Viruspartikel in die Zelle erfolgt durch Makropinozytose [32, 46, 49-51], wobei das Virus in Vesikeln ins Innere der Zellen und letztlich über den endo-lysosomalen *Pathway* in die späten Endosomen gelangt [32]. Von viraler Seite werden *Entry* und *Attachment* vom Glykoprotein GP vermittelt, welches ein Klasse I-Fusionsprotein ist [32]. GP ist ein Triplet von Heterodimeren, wobei diese aus der Rezeptorbindungs-Untereinheit (GP1) und der Fusionsuntereinheit (GP2) bestehen [52]. Durch den niedrigen pH-Wert in den späten Endosomen werden die Cysteinproteasen Cathepsin B und L aktiviert und GP1 in eine 19 kDa schwere, fusogene Form prozessiert [53-56]. Erst in dieser Form ist die Rezeptorbindestelle auf GP1 zugänglich [57], so dass EBOV-GP mit dem intrazellulären Rezeptor Niemann Pick C1 (NPC1) interagieren kann [58]. Durch die Bindung wird die GP2-abhängige Membranfusion zwischen der Virushülle und der endosomalen Membran eingeleitet und das virale Nukleokapsid in das Cytosol der Wirtszelle entlassen, wo die Transkription, Replikation und die Entstehung der Nachkommenviren stattfindet [32] (Abbildung 2).

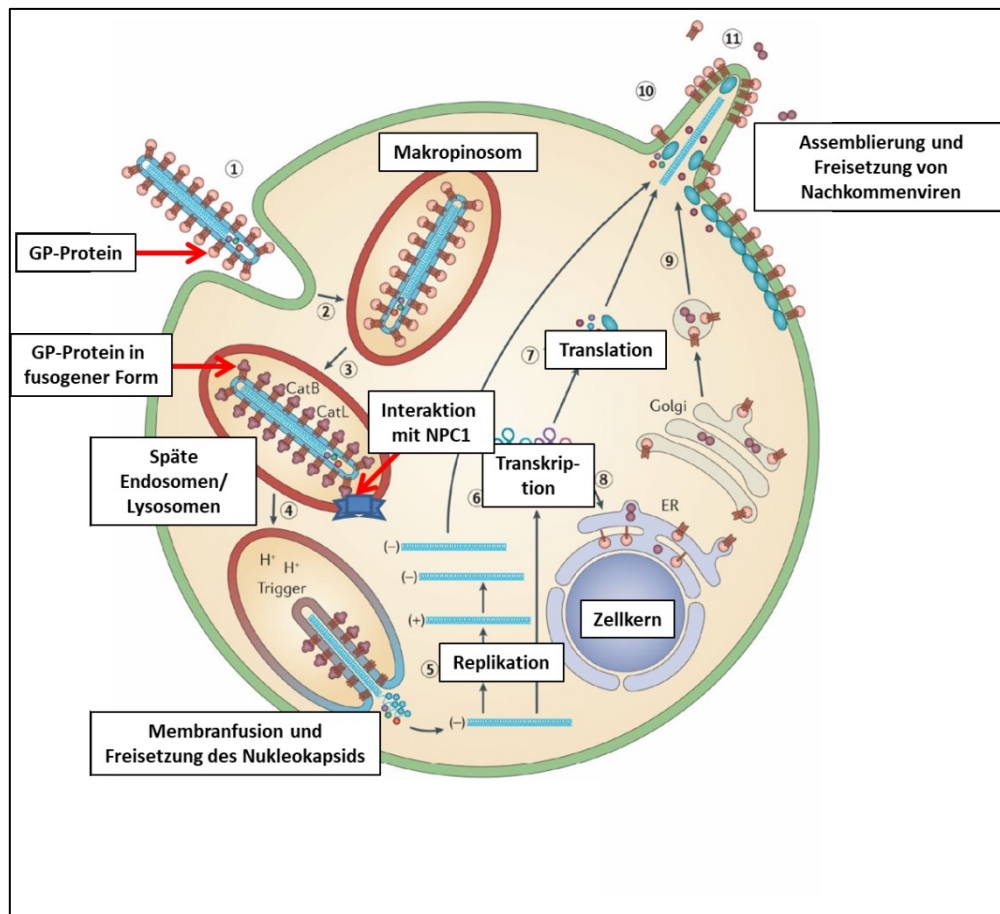


Abbildung 2: Ebolaviraler Replikationszyklus in Anlehnung an [59]

1) *Attachment* von Ebolaviruspartikel über GP-Protein; 2) Aufnahme durch Makropinozytose; 3) Viruspartikel gelangt über den endo-lysosomalen *Pathway* in die späten Endosomen/Lysosomen; dort Prozessierung von GP1 in eine 19 kDa schwere, fusogene Form; Interaktion mit NPC1; 4) Membranfusion und Freisetzung des viralen Nukleokapsids in das Cytoplasma der Wirtszelle; 5) Replikation, 6) Transkription und 7) Translation der viralen RNA; 8-11) Assemblierung und Freisetzung von Nachkommenviren.

Die Schlüsselkomponente für den filoviralen *Entry*-Prozess ist das integrale Membranprotein NPC1 [59-62], welches essentiell für das Ebola virus [61, 63, 64], Marburg virus [60] und Měnglà virus (MLAV) [7] ist. NPC1 *Knockout*-Zellen sind refraktär gegenüber der Infektion mit EBOV [30, 31]. Zu den wenigen Zellen, die außerdem refraktär gegenüber Filovirusinfektionen sind, gehören auch die Lymphozyten (B-, T- und NK-Zellen) von Menschen und nichtmenschlichen Primaten [30, 31]. Obwohl relativ hohe NPC1-Rezeptor-Expressionslevel in humanen T-Zellen vorliegen [65], werden abortive Infektionen in diesen Zellen beobachtet [66]. NPC1 ist hochkonserviert

innerhalb der Mammalia [31] und wird ubiquitär in allen humanen Zellen exprimiert [31, 67], wobei viele humane Gewebe und Zelllinien hohe NPC1-Rezeptor-Expressionslevel aufweisen [65, 68-70]. Humane Gewebe oder Zellkulturen, in denen der NPC1-Rezeptor nicht exprimiert wird, wurden von gesunden Spendern bisher nicht beschrieben. NPC1 ist am intrazellulären Transport von Cholesterol beteiligt [30, 71]. Mutationen im *NPC1*-Gen führen dazu, dass der Cholesterolexport aus den Lysosomen gestört ist und sich die sog. Niemann-Pick-Krankheit (Morbus Niemann-Pick) manifestiert. Hierbei handelt es sich um eine seltene, vererbte neurodegenerative Erkrankung [71-73].

1.2 Viruspersistenz und immunprivilegierte Organe

Infektionen mit den meisten nicht-retroviralen RNA-Viren führen zu akuten Virusinfektionen, bei denen das Immunsystem die virusinfizierten Zellen innerhalb weniger Wochen vollständig eliminiert [74]. Die *Virus-Clearance* ist typischerweise mit einer Immunität vor Reinfektionen verbunden. Für Viren, die ausschließlich zu akuten Infektionen führen, müssen kontinuierlich susceptible Individuen vorhanden sein, damit das Virus in der Population weiter existieren kann. Bei einigen Spezies mit sehr hohen Populationsdichten, wie sie beispielsweise in Fledermaus- und Flughundkolonien vorzufinden sind, kann die rasante Virusausbreitung zu einem Abfall an suszeptiblen Individuen durch die Induktion von protektiver Immunität führen, so dass keine weitere Virustransmission in der Population mehr möglich wäre. Da es sich bei Viren um obligate, intrazelluläre Parasiten handelt, mussten sich Strategien evolvieren, die die weitere Existenz des Virus in der Population gewährleisten. Eine mögliche Strategie stellt dabei die Etablierung von persistenten Virusinfektionen zumindest in einigen Individuen dar, die dann als Reservoir für das Virus innerhalb der Wirtspopulation fungieren. Grundsätzlich muss die persistente Infektion von Organismen von der Viruspersistenz in Zellkultur differenziert werden [75].

Beispiele für RNA-Viren, die persistente Virusinfektionen in Organismen etablieren können, sind das Maul- und Klauenseuchevirus (FMDV, *Foot and mouth disease virus*) [76, 77], das Virus der Bornaschen Krankheit (BDV, *Borna disease virus*) [78-80], das Blauzungenvirus (BTV, *Bluetongue virus*) [81, 82], das Masernvirus (MeV) [83-85], das Hepatitis-C-Virus (HCV) [86-88] und das Zika-Virus (ZIKV) [89-91].

Für die persistente Infektion von Organismen ist eine ausreichende Menge suszeptibler Zellen notwendig, die im Einklang und im notwendigen Tempo mit der Virusvermehrung replizieren und die Immunantworten des Wirtes überleben [75]. Sowohl virale als auch Wirtsfaktoren beeinflussen den Mechanismus der Viruspersistenz [74]. Für die Etablierung der persistenten Infektion muss einerseits die Eliminierung des Virus durch das Immunsystems des Wirtes, als auch die Zerstörung aller infizierten Zellen verhindert werden. Wenn eine Zelle große Mengen viraler Proteine synthetisiert, ist eine direkte Zellzerstörung durch die Virusreplikation oder durch das Immunsystem wahrscheinlich. Daher muss für die Etablierung von persistenten Infektionen zumindest in einigen Zellen die Virusreplikation heruntergefahren werden. Dabei sind unterschiedliche Persistenz-Strategien bekannt, wie beispielsweise Virusreplikation auf sehr niedrigem Niveau in mit dem Virus der Bornaschen Krankheit infizierten Zellen oder Blauzungenvirus-infizierte Zellen, bei denen keine Replikation zu beobachten ist, das Virus aber in intrazellulären Vesikeln von Erythrocyten detektiert werden kann. Auch besteht theoretisch die Möglichkeit, dass innerhalb eines Wirtes Virusvarianten mit reduzierter Cytopathogenität im Laufe der Zeit selektiert werden, die persistente Infektionsverläufe erst ermöglichen [74, 75, 92-95]. Auch die verstärkte Bildung von DI-Partikeln (Defekte interferierende Partikel) und die damit verbundene Konkurrenz um zelluläre und virale Genprodukte, führt zum Dämpfen der Virusreplikation und kann so zur Etablierung von Viruspersistenz beitragen [75, 96-100]. Auch für EBOV wurde die Bildung von DI-Partikeln und persistente Infektionen von Vero-Zellen beobachtet [101].

Ein wesentlicher Wirtsfaktor, der die mögliche Etablierung von persistenten Infektionen beeinflusst, ist das Immunsystem [74]. Eine Vielzahl von RNA-Viren

können in immundefizienten Individuen persistente Infektionen entwickeln. Für die Etablierung von persistenten Infektionen in immunokompetenten Individuen, mussten Viren Immunevasionsmechanismen evolvieren, um der Eliminierung durch Apoptose, Interferon (IFN)-Antworten, Antikörper- und T-Zell-Antworten zu entgehen.

Eine mögliche Strategie ist dabei die Persistenz in immunprivilegierten Organen [74, 102]. Dabei handelt es sich um Gewebe, die ein größeres Risiko von Schädigung durch das Immunsystem haben, so dass hier proinflammatorische Immunantworten stark unterdrückt werden [25, 103]. Beispiele sind das Gehirn, die Augen und der Hoden, die durch physiologische Barrieren (Blut-Hirn- [104], Blut-Augen- [105, 106] und Blut-Hoden-Schranke [107]) von der Wirkung des übrigen Immunsystems separiert werden [108]. Auch wird eine geringere Ansprechempfindlichkeit gegenüber Cytokinen und anti-inflammatorische Immunregulationen in diesen Organen beschrieben [25, 109].

Auch für EBOV wurden während des Ausbruchs in Westafrika 2014-2016 verstärkt persistierende Infektionen in immunprivilegierten Organen des Menschen beobachtet, die dann als Gewebe-Reservoir für das Virus dienen [110-112]. Wie bei den humanen Infektionen mit EBOV etablieren sich auch in Makaken persistierende Infektionen in Hoden, Augen und Gehirn [113] und auch MARV etabliert eine testikuläre Persistenz in Makaken [114]. Beim Menschen konnte in verschiedenen Studien, nach Genesung und *Clearance* von EBOV aus dem Blut, infektiöses Virus noch längere Zeiträume im Samen, Kammerwasser des Auges, Urin, Muttermilch und in der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) nachgewiesen werden [115-120]. Infektionen der Hoden können sexuelle Virustransmission auf andere Individuen ermöglichen [74], wofür es bei EBOV diverse Fallbeispiele gibt [121-123]. Das Virus kann in einer kleinen Anzahl von Individuen über Monate oder sogar Jahre persistieren, die dann eine potenzielle Quelle für zukünftige Ausbrüche darstellen könnten [74, 110, 124]. Auch sind bereits Fälle von rezidivierenden Infektionen nach Beendigung der Virämie beobachtet worden [108, 125, 126]. Obwohl seit dem EBOV-Ausbruch in Kikwit in der DR Kongo 1995 [127] verschiedene Studien zu EBOV-Persistenz im Menschen durchgeführt wurden,

gab es nur wenige Untersuchungen, die sich mit der Persistenz in Tieren beschäftigt haben [25]. Nach unserem Wissen handelt es sich bei der in Abschnitt 4.4 durchgeführten Untersuchung zu EBOV-Persistenz in Primärzellen von *M. condylurus* um die erste Persistenzstudie mit Filoviren in Zellen von einer als Reservoirspezies relevanten Fledermaus. Die Fähigkeit von EBOV, eine geringe Zahl von menschlichen Individuen persistierend zu infizieren, könnte die intrinsische Fähigkeit des Virus widerspiegeln, auch im natürlichen Reservoir eine persistierende Infektion zu etablieren [74]. Die Mechanismen, warum beispielsweise Hantaviren [128-131] und vermutlich auch Ebolaviren in ihrem natürlichen Reservoir persistente, inapparente Infektionen etablieren können, aber schwere Erkrankungen in anderen Wirten hervorrufen, sind im Detail nicht bekannt. Möglicherweise funktionieren die im natürlichen Reservoir evolvierten Mechanismen, die Virusreplikation zu reduzieren, nicht in den anderen Spezies [74].

1.3 Flughunde und Fledermäuse

Die Chiroptera (Fledertiere) stellen mit derzeit 1300-1400 Spezies [132-134] etwa 20 % aller existierenden Säugetierarten dar [133] und bilden damit nach den Nagetieren die zweitgrößte Ordnung innerhalb der Mammalia [135]. Innerhalb der Chiroptera wurden ursprünglich die relativ großen Megachiroptera (Flughunde) mit Körpergewichten zwischen 100 bis 1000 g und die Microchiroptera (Fledermäuse) unterschieden [136]. Die meisten Fledermausspezies sind insektivor und klein mit Gewichten zwischen 5 bis 20 g, nur wenige Spezies sind größer und können bis 100 g wiegen. Im Ergebnis neuerer DNA-Studien wurden die Rhinolophoidae mit den Megachiroptera zu der Unterordnung Yinpterochiroptera zusammengefasst und von den übrigen Microchiroptera, die nun die Unterordnung Yangochiroptera bilden, abgegrenzt [137].

1.3.1 Phylogenie, Verbreitung und Lebensweise von *M. condylurus*

Innerhalb der Yangochiroptera befindet sich in der Familie Mollosidae (Bulldoggfledermäuse) in der Gattung *Mops* die im Rahmen dieser Doktorarbeit untersuchte Fledermausspezies *Mops condylurus* (Angola-Bulldoggfledermaus) [138]. In Abbildung 3 ist die Phylogenie einiger afrikanischer Flughunde und Fledermäuse mit *M. condylurus* dargestellt.

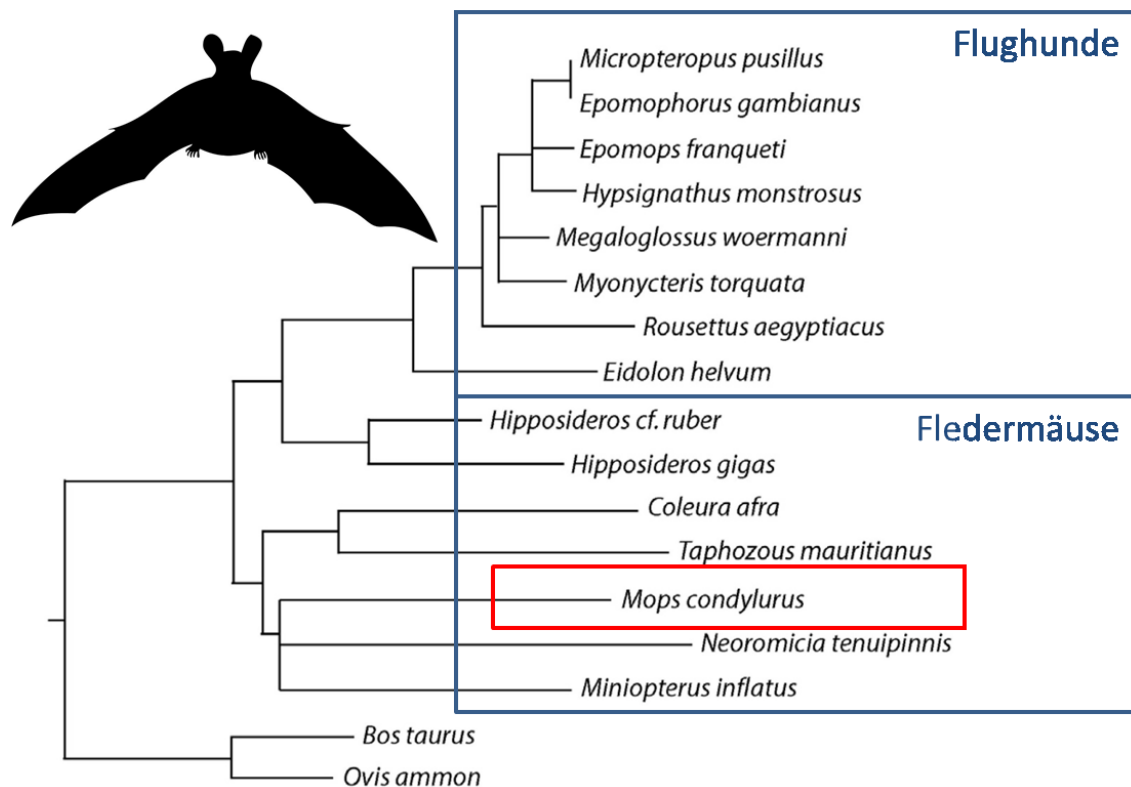


Abbildung 3: Phylogenie einiger afrikanischer Chiroptera mit *M. condylurus* in Anlehnung an [139]

Die Spezies ist weit verbreitet in Subsahara-Afrika (Abbildung 4) [140] und wird von der IUCN (*International Union for Conservation of Nature*, 2020) auch wegen der vermutlich großen Population als „nicht gefährdet“ eingestuft [141]. *M. condylurus* ist größtenteils in Trocken- und Feuchtsavannenhabitaten aber auch an den Rändern von Waldgebieten anzutreffen.

Als Fledermausquartiere nutzt *M. condylurus* Felsspalten, Höhlen, Hohlräume in Bäumen, aber auch anthropogene Strukturen [142, 143]. Insbesondere Hausdächer werden häufig als Quartiere genutzt [143], was auch bei der in

dieser Arbeit untersuchten Kolonie der Fall war. *M. condylurus* ist insektivor, wobei Coleoptera (Käfer), Hemiptera (Schnabelkerfen), Lepidoptera (Schmetterlinge) und Diptera (Zweiflügler) als Beutetiere beschrieben werden [142-144].

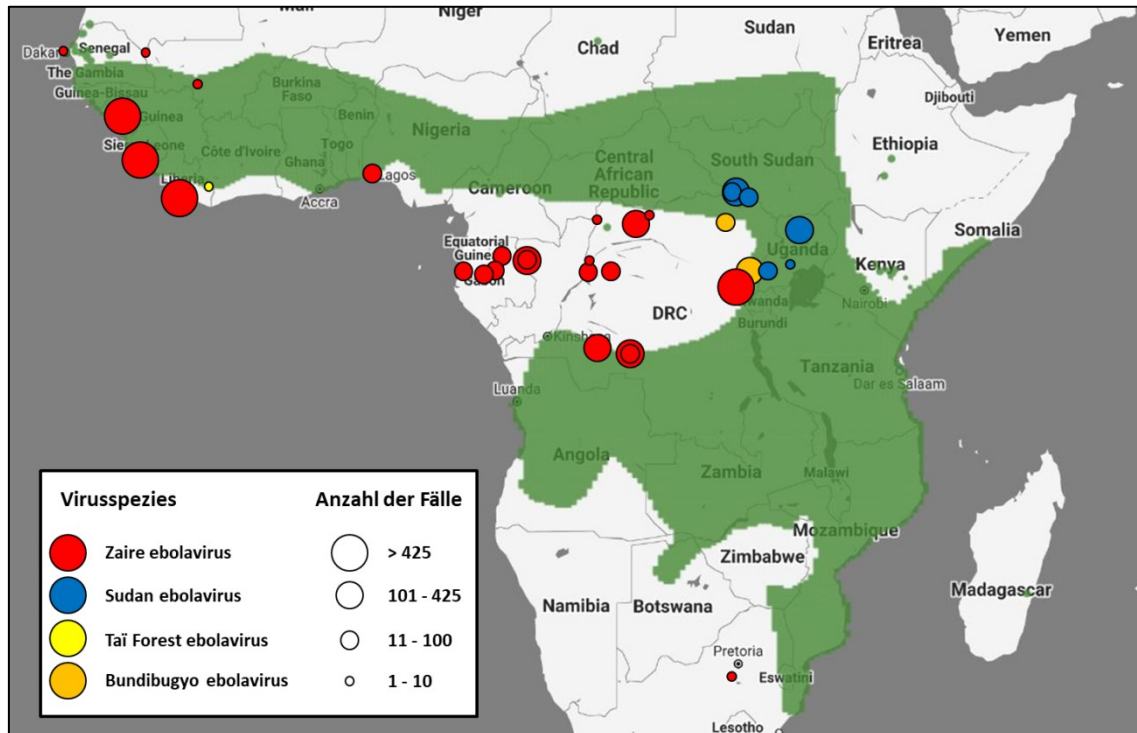


Abbildung 4: Vorkommen von *M. condylurus* [140] und Ausbrüche der Ebolaviruserkrankung in Anlehnung an [14]

Die Fledermausspezies *M. condylurus* ist weit verbreitet in Subsahara-Afrika. Grün: Bereiche, in denen die Spezies vorkommt. Ausbrüche der Ebolaviruserkrankung seit 1976 werden durch Kreise gekennzeichnet. Die Virusspezies werden durch unterschiedliche Farben und die Anzahl der Fälle bei den Ausbrüchen durch die Größe der Kreise dargestellt.

Die Tiere haben zwei Geburten pro Jahr und bekommen dabei pro Wurf nur ein Jungtier [145], wobei die Tragzeit 85 Tage beträgt und die Weibchen bereits im ersten Jahr geschlechtsreif werden [146]. Die Populationen in den Quartieren können wenige oder teilweise tausende Tiere umfassen [142, 143]. Die große Anzahl von Tieren in großer Nähe in einigen Kolonien begünstigt Virustransmissionen und die dauerhafte Zirkulation von Viren in der Population [147]. In Abbildung 4 sind neben dem Vorkommen von *M. condylurus* die Ausbruchsregionen der Ebolaviruserkrankung in Afrika seit 1976 dargestellt [14].

1.3.2 Biologische Eigenschaften von Chiroptera als Virusreservoir

Chiroptera haben einige Adaptationen ausgebildet, die einzigartig innerhalb der Säugetiere sind [133]: Dazu zählen u.a. die Fähigkeit zum aktiven Fliegen, die ausgesprochen lange Lebensdauer, die Echolokation, und das einzigartige Immunsystem. Einige dieser Eigenschaften könnten Hinweise darauf liefern, wie Chiroptera Virusreservoir darstellen und wie sie an der Transmission von Viren beteiligt sind, ohne bei Infektion selbst Krankheitssymptome zu entwickeln.

Chiroptera sind die einzigen Mammalia, die zum aktiven Flug befähigt sind, wobei sie teilweise hunderte oder sogar tausende Kilometer zurücklegen können [136, 147]. Dadurch können Viren auch über größere Distanzen verbreitet werden [148, 149]. Während des Fluges wurden in Fledermäusen hohe metabolische Raten mit einem 30-fach höherem Sauerstoffverbrauch als im Ruhezustand und ein Anstieg der Körpertemperatur gemessen [150].

Chiroptera haben eine bis zu zehnmal längere Lebensdauer, als man aufgrund der geringen Körpergröße und der hohen Stoffwechselraten erwarten würde [133, 151]. Die lange Lebensdauer erhöht wiederum die Möglichkeit von Virustransmissionen [147]. Persistente Infektionen in langlebigen Chiroptera würden zu einer signifikanten Erhöhung der Basisreproduktionszahl R_0 und einem erhöhtem Potenzial für Intra- und Interspeziesübertragungen von Viren führen [152]. Mit mehr als 40 Jahren weist die Fledermaus *Myotis brandtii* bei einem Körpergewicht von 4 bis 8 g die längste dokumentierte Lebensdauer bei Chiroptera auf [153, 154]. Die Tiere zeigen außerdem kaum Anzeichen von Seneszenz, wie Zunahme der Mortalität oder Abnahme der Fertilität im hohen Alter [155], und die Tumorgenese-Raten sind vernachlässigbar gering [133, 156]. Da Chiroptera keinerlei Symptome nach Infektion mit verschiedenen für Menschen hochpathogenen Viren wie dem Hendra-, Nipah- oder Marburgvirus zeigen [157, 158], sind generell zwei Szenarien denkbar [149]: So könnten Chiroptera „resistenter“ sein und die Virusreplikation effizienter kontrollieren als Menschen. Demgegenüber könnten sie auch eine „Toleranz“ entwickelt haben und trotz Virusreplikation ihre Gesundheit und Fitness beibehalten [159, 160]. Genomanalysen des Flughundes *R. aegyptiacus* liefern Hinweise, dass nicht

effektivere antivirale Mechanismen, sondern eine erhöhte Toleranz für die beobachteten asymptomatischen Infektionen verantwortlich sein könnten [161]. Das IFN-System stellt in Vertebraten eine der ersten Verteidigungslinien gegen virale Infektionen dar und könnte daher für eine mögliche schnelle Kontrolle der Virusreplikation und die asymptomatische Koexistenz von Chiroptera mit Viren entscheidend sein [162]. Mit verschiedenen Zellkulturen aus Chiroptera wurden Untersuchungen des angeboren Immunsystems, insbesondere des Typ-I-Interferonsystems, durchgeführt [162-166]. In nicht-stimulierten Zellen aus der Flughundgattung *Pteropus* konnte eine konstitutive Expression von IFN- α festgestellt werden, die nach Stimulation oder Infektion nur wenig zunahm [165]. Eventuell ist dadurch eine schnellere Interferonantwort ohne Verzögerung in Flughunden der Gattung *Pteropus* möglich [149]. Hinweise darauf, dass die ausgelösten Interferonantworten kürzer andauernd und weniger zellschädigend als in humanen Zellen ablaufen, könnten erklären, wie die konstitutive IFN-Expression in Flughunden der Gattung *Pteropus* toleriert wird [149].

1.3.3 Thermoregulation von *M. condylurus*

Vögel und viele Säugetiere können ihre Körpertemperatur auch bei stark wechselnden Umgebungstemperaturen auf einen konstanten Sollwert einregeln und werden als homoiotherm („gleichwarm“) bezeichnet [167, 168]. Die Sollwerte der Thermoregulation betragen in der Regel für Placentalia, zu denen auch die Chiroptera zählen, 36-38°C. *M. condylurus* hat besondere Mechanismen der Thermoregulation entwickelt und kann dadurch unterschiedlichste klimatische Bedingungen tolerieren und eine Vielzahl von Habitaten nutzen [142, 143].

1.3.3.1 Torpor und niedrige Körpertemperaturen

Eine mögliche Strategie einiger Chiroptera ist die Heterothermie, wobei die Tiere fakultativ ihre Körpertemperatur in Anpassung an die Umgebungstemperatur absenken, um Energie zu sparen. Als Torpor bezeichnet man den Zustand stark herabgesetzter Stoffwechselaktivität während der tagesperiodischen Ruhephasen [167], wobei sich die

Körpertemperatur der Umgebungstemperatur annähert, um möglichst wenig Stoffwechselenergie für Thermoregulation aufwenden zu müssen [169]. Im Torpor sind die Tiere quasi poikilotherm („wechselwarm“), während sie im Aktivitätszustand homoiotherm sind [170]. Die Fähigkeit zum Torpor ist weit verbreitet innerhalb der Chiroptera und tritt auch bei tropischen Arten auf [171]. *M. condylurus* wird als thermolabil beschrieben, mit täglichen Phasen von Torpor und Körpertemperaturen, die sich entsprechend den Umgebungstemperaturen verändern, wobei im Winter Körpertemperaturen von 12°C gemessen werden konnten [172]. Bei Nacht bleiben die Tiere üblicherweise homoiotherm und weisen bei Umgebungstemperaturen zwischen 15-35°C Körpertemperaturen von durchschnittlich 35,2°C auf [173].

Tagsüber fielen die Tiere bei niedrigeren Umgebungstemperaturen in Torpor und wiesen bei 15°C Umgebungstemperatur, durchschnittliche Körpertemperaturen von etwa 20°C auf (Abbildung 5). Dabei betrug der Energieverbrauch der Tiere nur noch 17 % im Vergleich zu Tieren, die bei derselben Temperatur nicht im Torpor waren.

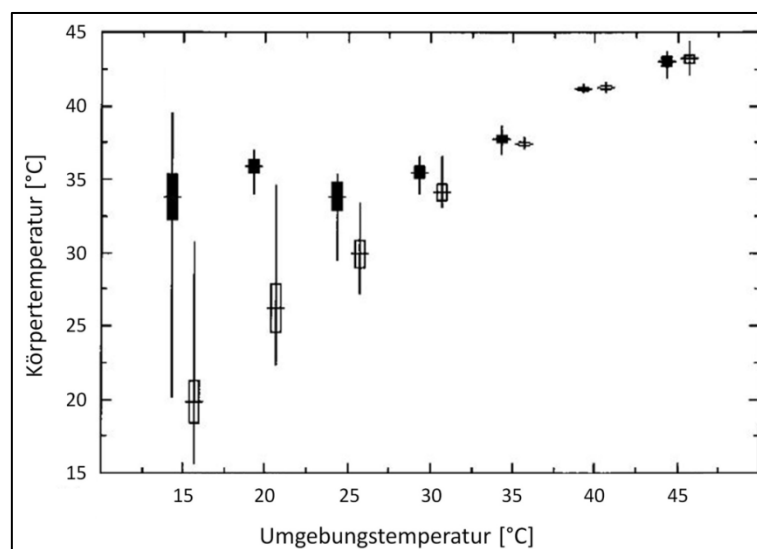


Abbildung 5: Körpertemperaturen von *M. condylurus* bei Umgebungstemperaturen zwischen 15°C bis 45°C in Anlehnung an [173]

Dunkle Balken indizieren die Temperaturmessung bei Nacht, helle Balken bei Tag. Die horizontalen Linien im Balken indizieren die durchschnittliche Körpertemperatur.

Niedrigere Körpertemperaturen und Stoffwechselraten könnten Immunantworten unterdrücken und die Virusreplikationsrate senken, so dass die Viruseliminierung aus Chiroptera verzögert wird [147, 156, 174].

1.3.3.2 Hohe Körpertemperaturen im Fledermausquartier und beim Flug

M. condylurus ist sehr tolerant gegenüber Hitze und nutzt Quartiere, die häufig Umgebungstemperaturen von über 40°C aufweisen, was letal für viele andere Chiroptera wäre [173]. So wurden für Quartiere von *M. condylurus* Spitzentemperaturen von über 60°C und teilweise mehr als 6 h pro Tag Temperaturen über 40°C beschrieben [175]. *M. condylurus* bevorzugt die heißesten Quartiere unter Hausdächern und erlaubt einen Anstieg der Körpertemperatur, um Energie zu sparen, die anderenfalls für Kühlmechanismen notwendig wäre [143]. Umgebungstemperaturen über 35°C führen zu einem Anstieg der Körpertemperaturen, wobei bei 45°C Umgebungstemperatur eine Körpertemperatur von 43°C gemessen wurde [173].

Die minimale Flugtemperatur von *M. condylurus* wurde in einer Studie auf ungefähr 35°C bestimmt, weshalb am späten Nachmittag, kurz vor Beginn der Nahrungssuche, die Körpertemperatur auf dieses Niveau angehoben wird [175]. Die durchschnittliche Körpertemperatur von fliegenden Fledermäusen der Art *M. condylurus* beim Verlassen des Quartiers betrug $40,5 \pm 1,1^\circ\text{C}$ [175]. Diese Körpertemperaturen ähneln den Temperaturbereichen, die mit 38-41°C typischerweise bei Fieber in Mammalia anzutreffen sind [176]. Im Flug gehen Schätzungen von einer 15-16-fachen Steigerung der Metabolismusraten in Chiroptera aus und wie beim Fieber könnte es zu einer Aktivierung verschiedener Komponenten des Immunsystems kommen, was einen Einfluss auf die Virulenz und Toleranz von Viren in dieser Fledermausspezies haben könnte.

Viren sind folglich in *M. condylurus* sehr niedrigen Temperaturen während des Torpors, als auch hohen Temperaturen tagsüber in den heißen Fledermausquartieren und nachts während des Fluges ausgesetzt. Der Einfluss

der Temperatur in *M. condylurus*-Zellen auf die filovirale Replikation und auf mögliche Viruspersistenz in den Zellen, wurde bisher noch nicht untersucht.

1.3.3.3 Relevante Umgebungstemperaturen von *M. condylurus* an der Elfenbeinküste

Der Norden der Elfenbeinküste zeichnet sich durch ein wechselfeuchtes Savannenklima mit relativ starken täglichen Temperaturschwankungen von 20°C aus [177]. Während im März und April die Temperaturen auf über 40°C ansteigen, werden im Dezember und Januar auch Tiefsttemperaturen von 10°C gemessen [177, 178]. Das Dorf Koffikro (Fangort) befindet sich im Süden des Landes, weniger als 20 Km von Abidjan entfernt. Das Klima dort ist tropisch mit Temperaturen zwischen 21-32°C (Abbildung 6). Aber auch in Abidjan können im Januar Tiefsttemperaturen von 15°C auftreten [179].

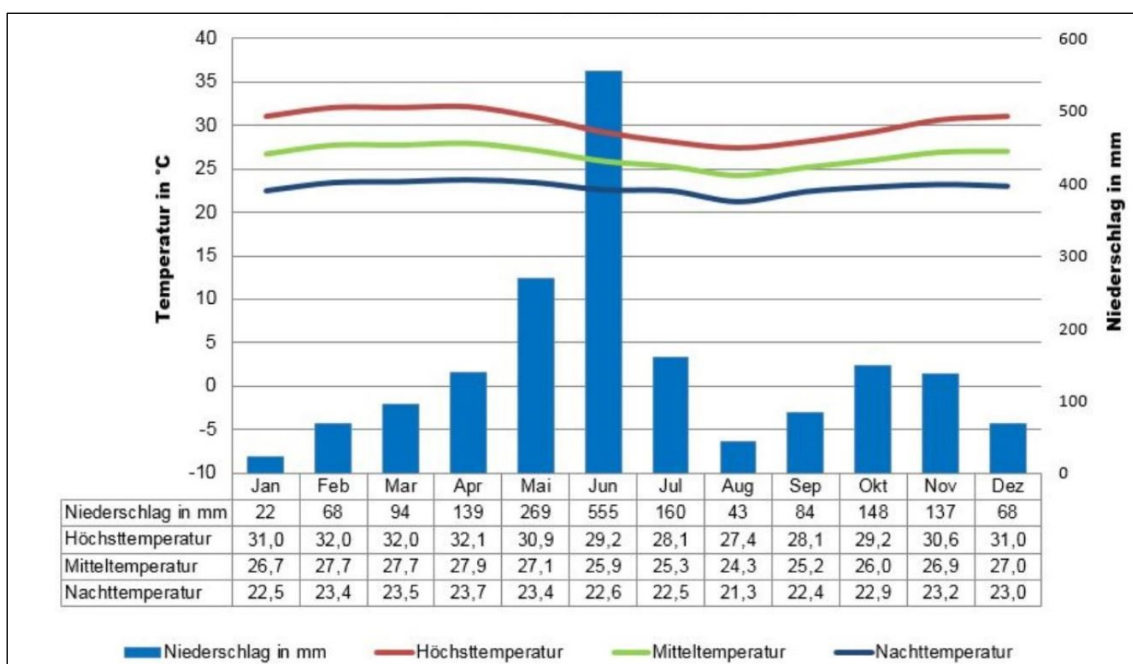


Abbildung 6: Klimadiagramm Elfenbeinküste (Abidjan) – Jahresübersicht [177]

1.3.4 Eintritt von Filoviren in Chiroptera-Zellen

Für Chiroptera-Zellkulturen wurde gezeigt, dass NPC1 eine genetische Determinante für die Suszeptibilität für Filoviren darstellt. NPC1-Sequenzvariationen in einigen Chiroptera-Spezies führen zu einer reduzierten

GP-NPC1-Interaktion, welches eine Adaptation des Wirtes an Filoviren darstellen könnte [180]. Diese Interaktion beeinflusst maßgeblich die zelluläre Suszeptibilität von Chiroptera für Filoviren, den filoviralen Replikationszyklus und die Virulenz [180]. Die Aminosäure 502 in der zentralen Region der Domäne C von NPC1 ist besonders wichtig für die Interaktion mit dem Ebola-GP-Protein [180-182]. Der Austausch einer einzelnen Aminosäure von Asparaginsäure zu Phenylalanin an dieser Position (D502F) führt dazu, dass Zellen des Flughundes *Eidolon helvum* refraktär gegenüber Infektionen mit EBOV sind [180].

1.3.5 Chiroptera als Reservoirwirte verschiedener Viren

1.3.5.1 Viruspersistenz im Reservoirwirt und Spillover-Ereignisse

Das natürliche Reservoir eines Infektionserregers ist definiert als eine oder mehrere epidemiologisch verbundene Populationen oder Umgebungen, in denen das Pathogen permanent existieren und von dort auf einen anderen Wirt übertragen werden kann [183]. Etwa 60 % der emergierenden Infektionskrankheiten werden durch Pathogene aus dem Tierreich ausgelöst und als Zoonosen bezeichnet [149, 184]. Chiroptera weisen einen signifikant höheren Anteil an zoonotischen Viren als alle anderen Mammalia auf [185] und stellen das natürliche Reservoir für eine Reihe im Menschen hochpathogener, emergierender Viren [186, 187] wie dem Hendra-, Nipah- [188] und Marburgvirus [189] dar. *Spillover*-Ereignisse aus Chiroptera sind bisher nur für RNA-Viren beschrieben [190], weil sich diese z.B. durch die höheren Mutationsraten bei der Replikation schneller an neue Wirte adaptieren können [149]. Um Vorhersagen möglicher *Spillover*-Ereignisse vornehmen zu können, ist die Identifikation des natürlichen Reservoirs im Tierreich wichtig [183]. In vielen Fällen koexistieren im Menschen hochpathogene zoonotische Viren mit ihrem natürlichen Reservoirwirt und verursachen dabei in ihm keinerlei Krankheitssymptome [149, 158, 191-193]. Die Identifizierung des Reservoirs ermöglicht grundlegende Einblicke in die unterschiedlichen Virus-Wirts-Interaktionen und immunologischen Prozesse [194, 195], was der Schlüssel zur

Behandlung von zoonotischen Erkrankung sein könnte [194, 195]. Bei der Suche nach dem natürlichen Reservoir eines Virus werden beispielsweise epidemiologische Untersuchungen vorgenommen oder versucht, eine natürliche Infektion im Tier durch Detektion des Virus oder virusspezifischer Antikörper nachzuweisen [149, 183]. Auch phylogenetische Analysen können zur Identifikation eines natürlichen Reservoirwirtes beitragen [196]. Das essentielle Kriterium für die Identifizierung eines natürlichen Reservoirs ist jedoch der Nachweis der Persistenz der Infektion in der Reservoirspezies, welcher nur durch Langzeitstudien zu erbringen ist [183, 197].

In einer Langzeitstudie mit dem Flughund *Pteropus vampyrus* wurde eine Gruppe von gefangenen Tieren ein Jahr auf Nipahvirus getestet [198]: Nach Monaten, in denen bei keinem der Tiere Nipahviren in Blut-, Rachenabstrich- oder Urinproben nachgewiesen werden konnten, wurde schließlich infektiöses Nipahvirus im Urin eines Tieres detektiert, weshalb die Autoren von einer Persistenz des Virus in bestimmten Organen ausgehen. In einer weiteren Langzeitstudie mit dem Flughund *R. aegyptiacus* wurden experimentell mit MARV-infizierte Tiere mit nicht-infizierten Kontakttieren zusammen gehalten [199]. Ein Kontakttier wurde vier Monate nach der ursprünglichen Inokulation infiziert, und drei Kontakttiere entwickelten nach sieben Monaten eine Virämie. Auch in diesem Experiment könnte eine Viruspersistenz in bestimmten Organen der Flughunde die Erklärung für die späten Infektionen sein [199, 200].

Derzeit ungeklärt ist, warum *Spillover*-Ereignisse vom Chiroptera-Reservoir auf den Menschen sporadisch und selten auftreten. Eine Hypothese ist, dass durch bestimmte physiologische und ökologische Faktoren eine verstärkte Virusreplikation und -ausscheidung in den persistent infizierten Chiroptera ausgelöst wird [201, 202], die für eine Infektion des Menschen notwendig ist. Abnehmende Antikörpertiter und eine Suppression des angeborenen Immunsystems durch Stress könnten zur verstärkten Virusreplikation in der Reservoirspezies führen [200], wobei Ernährungsstress und Schwangerschaften hierbei Ursachen sein könnten [203-205].

1.3.5.2 Beispiele für Chiroptera als Reservoirwirte

Verschiedene Vertreter der Chiroptera wurden bereits als natürliches Reservoir für unterschiedliche Viren identifiziert. Zu den wenigen Viren, die symptomatische Infektionen bei Chiroptera auslösen, gehören das Rabiesvirus (RABV) und andere Lyssaviren [157, 206-210], für die verschiedene Chiropteraspezies als natürliche Reservoir identifiziert wurden [211-213]. Die Sterblichkeit bei Infektionen mit dem *Vampire bat rabies virus* (VBRF) in seinem natürlichen Reservoir, der Fledermaus *Desmodus rotundus*, beträgt dabei allerdings nur etwa 10 % und ist somit viel geringer als in anderen suszeptiblen Mammalia [214]. Für die hochpathogenen Hendra- und Nipahviren, die über Pferde bzw. Schweine als Zwischenwirte auf den Menschen übertragen werden, konnten verschiedene Vertreter der Flughundgattung *Pteropus* als natürliche Reservoir identifiziert werden [215, 216]. In China konnten Fledermäuse der Gattung *Rhinolophus* als ein mögliches Reservoir des SARS-Coronavirus (CoV) identifiziert werden, welches über Zibetkatzen als Zwischenwirt übertragen wird [217-219]. Für MERS-CoVs scheinen Dromedare ein natürliches Reservoir darzustellen [220-223], wobei auch hier wahrscheinlich Chiroptera das ursprüngliche Reservoir bilden [222]. So konnten verschiedene nah verwandte Coronaviren in unterschiedlichen Fledermausspezies nachgewiesen werden [224, 225]. Gegenwärtig hat das Coronavirus SARS-CoV-2, der Erreger von COVID-19 (*coronavirus disease 2019*), eine Pandemie ausgelöst, welche im Dezember 2019 in Wuhan in China begann [226]. Bis zum 21. September 2020 waren bereits mehr als 31 Mio Menschen weltweit mit SARS-CoV-2 infiziert und mehr als 960.000 Menschen verstorben [227]. Das SARS-CoV-2-Virus weist 96,2 % Sequenzähnlichkeit zu einem Coronavirus aus Chiroptera (BatCoV RaTG13) auf, so dass ein Vertreter der Chiroptera auch für dieses neue Coronavirus als natürliches Reservoir vermutet wird [226, 228-230]. Persistente Infektionen mit Chiroptera-CoVs konnten in der Fledermausspezies *Myotis lucifugus* gezeigt werden, in denen nach viermonatigem Winterschlaf im Labor, Virus in Darm und Lungen einiger Tiere detektiert werden konnte [231]. Desweiteren gibt es verschiedene Hinweise darauf, dass Vertreter der Chiroptera auch als

natürliche Reservoirs für einige Hantaviren eine Rolle spielen [232-236]. Kürzlich wurde auch in *M. condylurus* ein bisher unbekanntes Hantavirus nachgewiesen, welches vorläufig als Kiwira virus bezeichnet wird [237]. Für andere Filoviren, das MARV und das RAVV, konnte der Flughund *R. aegyptiacus* eindeutig als ein natürliches Reservoir identifiziert werden [158, 189, 205, 238-244].

1.3.6 *M. condylurus* als potenzielles Reservoir von Ebolaviren

Hohe Fallsterblichkeitsraten in infizierten Menschenaffen und waldbewohnenden Antilopen (Duckern) weisen darauf hin, dass Virus und Wirt nicht ausreichend aneinander adaptiert sind und diese Tiere nicht das natürliche Reservoir für Ebolaviren darstellen [241, 245, 246]. Ausbruchsuntersuchungen und verschiedene Studien haben Hinweise darauf geliefert, dass Vertreter der Chiroptera wahrscheinlich auch das natürliche Reservoir von Ebolaviren darstellen [241, 247]. In ländlichen Regionen in Afrika sind regelmäßige Interaktionen zwischen Menschen und Chiroptera nicht ungewöhnlich [248, 249] und für verschiedene Ebolavirus-Ausbrüche gibt es Hinweise darauf, dass der Indexpatient vor der Infektion in Kontakt mit Chiroptera war [241, 250, 251]. Experimentelle Infektionen von *R. aegyptiacus* zeigten, dass diese Flughundspezies nicht das natürliche Reservoir für Ebolaviren darstellt [252, 253]. In einer Vielzahl von Studien wurden gefangene Chiroptera seropositiv für Ebolaviren getestet, wobei bisher der Nachweis in 307 individuellen Tieren von 17 verschiedenen Spezies in Afrika und Asien gelang [204, 241, 254-261]. Im Jahr 2005 konnte EBOV RNA in drei verschiedenen Flughundspezies detektiert werden (*Hypsignathus monstrosus*, *Epomops franqueti* und *Myonycteris torquata*) [254]. Seit dieser Zeit fokussierten sich viele Studien auf Flughunde als mögliches Reservoir, während insektivore Fledermäuse in der Ebolavirus-Reservoirforschung nur wenig Beachtung fanden [262].

Trotzdem gab es auch einige wenige Studien, die Hinweise darauf liefern, dass *M. condylurus* ein potenzielles Reservoir für Ebolaviren darstellen könnte. So konnten EBOV-spezifische Antikörper in dieser Fledermausspezies detektiert

werden [255]. Darüber hinaus replizierte EBOV in *M. condylurus* nach experimenteller Infektion, ohne dabei Krankheitserscheinungen hervorzurufen [191]. Virus konnte aus dem Blut und Organen isoliert werden, ohne dass histopathologische Veränderungen festzustellen waren. In epidemiologischen Untersuchungen des Ebola-Ausbruchs in Westafrika 2014-2016 gab es Hinweise, dass der Index-Patient mit Fledermäusen der Art *M. condylurus* in Kontakt gewesen sein könnte, bevor er erste Krankheitssymptome entwickelte [250]. Die kürzliche Entdeckung eines neuen Ebolavirus, dem Bombali virus, in zwei Fledermausspezies in Sierra Leone (*M. condylurus* und *Chaerephon pumilus*) [13] und der wiederholte Nachweis von BOMV RNA in *M. condylurus* in Kenia [263] und Guinea [264], verdeutlichen die Notwendigkeit, die Rolle von *M. condylurus* für die Ökologie von Ebolaviren weiter zu erforschen.

1.4 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten durch verschiedene experimentelle Ansätze Untersuchungen mit der Fledermausart *M. condylurus* durchgeführt werden, um Anzeichen für Virus-Wirts-Adaptationsprozesse und zelluläre Viruspersistenz zu finden und so die Bedeutung von *M. condylurus* als Reservoir für Ebolaviren besser beurteilen zu können.

Zunächst sollte eine Gruppe von Fledermäusen dieser Art an der Elfenbeinküste mit Unterstützung eines afrikanischen Partners gefangen und in Haltung genommen werden. In einer eigens zu diesem Zwecke konstruierten Käfiganlage sollten die Tiere über den Zeitraum von einem Jahr auf Viren untersucht werden, indem regelmäßig orale Abstriche und Urinproben mittels *Next Generation Sequencing* (NGS) analysiert werden. Dadurch sollten erste Einblicke in die virale Diversität in dieser Fledermausart und den zeitlichen Verlauf von Virusausscheidungen unter Berücksichtigung von saisonalen oder anderen biotischen/abiotischen Faktoren gewonnen werden.

Parallel sollten Primärzellkulturen und immortalisierte Zelllinien von *M. condylurus* aus möglichst vielen Organen etabliert werden, die als Grundlage für weiterführende Untersuchungen dienen. Die Expression des

zellulären Rezeptors NPC1, essentiell für die Replikation von Filoviren, sollte in den etablierten Fledermauszellkulturen mit bekannten humanen und Affenzellkulturen verglichen werden, um Unterschiede zwischen Mensch bzw. Affe und der möglichen Reservoirspezies *M. condylurus* auf Rezeptorebene darzustellen.

Daran anschließend sollten mit den Fledermauszellkulturen Infektionsexperimente im Hochsicherheitslabor mit Ebolaviren durchgeführt werden und die Virusreplikationskinetik mit der Kinetik in Kontrollzellen verglichen werden. Darüberhinaus sollte untersucht werden, ob EBOV eine persistierende Infektion in Fledermaus-Primärzellen etablieren kann, was einen weiteren Hinweis auf die Rolle dieser Fledermausart als Reservoir für Ebolaviren liefern könnte.

Eine besondere biologische Eigenschaft von *M. condylurus* besteht darin, die Körpertemperatur zu einem gewissen Umfang der Umgebungstemperatur anzupassen. Im letzten Abschnitt dieser Doktorarbeit sollte daher untersucht werden, ob die Fledermaus-Primärzellen bei niedrigen (27°C) und hohen (42°C) Temperaturen kultiviert werden können und welchen Einfluss diese Temperaturen auf die filovirale Virusreplikation haben. Möglicherweise könnte diese biologische Eigenschaft von *M. condylurus* eine Möglichkeit darstellen, wie *in vivo* die Virusreplikation und Übertragung innerhalb einer Fledermauskolonie beeinflusst wird.

2 Material

2.1 Chemikalien, Medien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller	Produktnummer
2-Mercaptoethanol	Carl Roth	4227.3
Acti-stain 555 Phalloidin	Cytoskeleton	PHDH1-A
Agarose UltraPure™	Invitrogen™	16500500
Albumin Fraktion V	Carl Roth	0163.2
Antibiotic-Antimycotic (100x)	Gibco™	15240062
Chloroform-Isoamyl-Alkohol-Mix	Merck	25666
CytoFLEX Daily QC Fluorospheres	Beckman Coulter	B53230
CytoFLEX Sheath Fluid	Beckman Coulter	B51503
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma	276855
Dispase I	Sigma-Aldrich	P3417
DNA Gel Loading Dye (6x)	Thermo Scientific™	R0611
Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (DMEM)	Sigma-Aldrich	D6546
Dulbeccos's Modified Eagle Medium / Nutrient Mixture F12 (DMEM/F12)	Sigma-Aldrich	D8437
Essigsäure 100 %	Carl Roth	3738.4
Ethanol absolut	Merck	1070172511
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma-Aldrich	E9884
Fetales Rinderserum (FBS)	Biochrom	1318D
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Scientific™	SM0241
Glycin	Carl Roth	3908
Hepatocyte Wash Medium	Gibco™	17704024
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Biowest	L0190-500
Isofluran	cp-pharma®	1214
Kollagen I (aus Rattenschwanz)	Sigma-Aldrich	C7661
Kollagenase A	Sigma-Aldrich	10103578001
L-Glutamine 200mM (100x)	Gibco™	25030-081
Liver Digest Medium	Gibco™	17703034
Macrophage Growth Supplement (MaGS) (100 x)	ScienCell	1972
Midori Green Advance DNA Stain	Nippon Genetics	MG04
Paraformaldehyd	Carl Roth	0335.1
Paraformaldehyd (PFA) 4 % in PBS (pH 7.4)	Morphisto	1.176.201.000

Bezeichnung	Hersteller	Produktnummer
Penicillin-Streptomycin (10000 U/mL) 100x (Pen-Strep)	Gibco™	15140122
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biochrom	L1820
Rattenschwanz Kollagen Typ I	Sigma-Aldrich	C7661
Recovery™ Cell Culture Freezing Medium	Gibco™	12648010
RNaseOUT™ RNase Inhibitor	Invitrogen™	10777019
ROTI® Mount FluorCare DAPI	Carl Roth	HP20.1
TRIS	Carl Roth	4855.1
Triton® X 100	Carl Roth	3051.3
TRIzol™ LS Reagent	Invitrogen™	10296028
Trypanblau-Lösung (0,4 %)	NanoEnTek	EVS-050
Trypsin-EDTA Lösung (0,25 %)	Sigma-Aldrich	T4049
Tween® 20	Carl Roth	9127.1
William's E Medium, GlutaMAX™ Supplement	Gibco™	32551020

2.2 Puffer und Zellkulturmedien

Anwendung	Puffer / Medium	Zusammensetzung
Agarose-Gelelektrophorese	Elektrophoresepuffer 0,5 x TAE	20 mM TRIS, 10 mM Essigsäure, 0,5 mM EDTA (pH 7,8)
Durchflusszytometrie Konfokale Mikroskopie	Fixierungspuffer	4 % Paraformaldehyd in PBS
	Quenchingpuffer	0,3 M Glycin in PBS (pH 7,4)
	Permeabilisierungspuffer	0,1 % Triton® X 100-Lösung in PBS
	PBST (Waschpuffer)	0,1 % Tween® 20-Lösung in PBS
	Blockpuffer	1 % Albumin Fraktion V in PBST
	FACS-Puffer	PBS mit 2 % FBS, 1 mM EDTA, 0,1 % Natriumazid, pH 7,4
Langzeitbeobachtung von Fledermäusen an der Elfenbeinküste	Transportpuffer für Oralabstrichproben und Fledermausurin	PBS, 1 % Albumin Fraktion V, 1 x <i>Antibiotic-Antimycotic</i>
Zellkultur	Einfriermedium	90 % FBS, 10 % DMSO
	Fledermaus-zellkulturmedium	DMEM / F12, 5 % bzw. 15 % FBS, 2 x <i>Antibiotic-Antimycotic</i>

Anwendung	Puffer / Medium	Zusammensetzung
	Leberzellkulturmedium	William's E Medium, GlutaMAX™ Supplement, 5 % bzw. 15 % FBS, 2 x <i>Antibiotic-Antimycotic</i>
	Zellkulturmedium für humane / Affenzelllinien und Virustitrationen	DMEM, 5 % / 10 % / 15 % FBS, 2 mM Glutamin, 1 x Penicillin-Streptomycin

2.3 Kommerzielle Kits

Bezeichnung	Hersteller	Produktnummer
AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit	Thermo Fisher	4387391
DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment	New England BioLabs	M0210L
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche	11732676001
HiSeq SBS Kit V4	Illumina®	FC-401-4003
HiSeq SR Cluster Kit v4 cBot	Illumina®	GD-401-4001
Live/Dead™ Fixable Violet Dead Cell Stain Kit	Thermo Fisher	L34964
MinElute PCR Purification Kit	Qiagen	28006
NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5	Illumina®	20024907
NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-Up Kit	Macherey-Nagel	740609250
peqGOLD Viral DNA/RNA Kit	PEQLAB	732-3094
Platinum™ Taq DNA Polymerase Kit	Invitrogen™	10966034
QIAamp Viral RNA Mini Kit	Qiagen	52906
Qubit™ dsDNA HS Assay Kit	Invitrogen™	Q32854
RNase-Free DNase Set	Qiagen	79256
Sequenzierkit BigDye™ Terminator v3.1	Applied Biosystems™	4337454
SuperScript™ II Reverse Transcriptase Kit	Invitrogen™	18064071
TransDux MAX™ Kit	SBI	LV860A-1
Transfektionskit Lipofectamine™ 3000	Invitrogen™	L3000001
Turbo DNA-free™ Kit	Invitrogen™	AM1907
ViraDuctin™ Lentivirus Transduction Kit	Cell Biolabs	LTV-200

2.4 Primer

Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
1	EBOV-FW	ACTCCTACTAATCGCCCGTAAG

Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
2	EBOV-RV	ATCAGCCGTTGGATTTGCT
3	EBOV-Sonde	FAM-CACCCAAGGACTCGC-MGB
4	Fledermaus-Spezies-FW	CCCCACCCCATATTAAACCAGAGTGATA
5	Fledermaus-Spezies-RV	TAACATGAATTGGAGGACAACCTGTTGA
6	K8N Random Primer	GACCATCATGCGACCTCCACNNNNNNNN
7	K-Primer	GACCATCATGCGACCTCCAC
8	MARV-FW	AAGCATTCCCTAGCAACATGATGGT
9	MARV-RV	GTGAGGAGGGCTATAAAAGTCACTGACATG
10	MARV-Sonde	FAM-CCTATGCTTGCTGAATTGTGGTGCCA-BHQ1

2.5 Antikörper

Name	Antigen	Hersteller	Produktnummer
Primärantikörper			
Anti-EBOV-NP (AA 630-739) Antikörper	EBOV-NP	antibodies-online.com	ABIN5506751
Anti-Niemann Pick C1 Antikörper	NPC1 (human)	abcam	ab55706
SV40T-Ag Antikörper (Pab 101)	SV40T-Ag	Santa Cruz Biotechnology	sc-147
Sekundärantikörper			
Esel Anti-Maus IgG H&L (Alexa Fluor® 647)	Maus	abcam	ab150111
Ziege Anti-Maus IgG H&L (Alexa Fluor® 488)	Maus	Dianova	115-545-003
Isotypkontrolle			
Maus IgG2a Kappa Leichte Kette Isotypkontrolle	TNP und KLH	Novus Biologicals	NB600-986

2.6 Zellkulturen

Zusätzlich zu den in Tabelle 6 beschriebenen Primärzellen und Zelllinien aus Fledermäusen wurden folgende Zelllinien in dieser Doktorarbeit verwendet:

Zelllinie	Detailinformationen	Bezugsquelle
HEK293 ATCC	humane embryonale Nierenzelllinie	Robert Koch-Institut, ZBS 5 Stammsammlung
HEK293 Δ NPC1	humane embryonale Nierenzelllinie ohne den zellulären Rezeptor NPC1 (CRISPR/Cas9 Knockout)	King's College London, Arbeitsgruppe Stuart Neil
HeLa ATTC	humane Epithelzelllinie aus einem Zervixkarzinom	Robert Koch-Institut, ZBS 5 Stammsammlung
Vero UNC	Nierenepithelzelllinie aus der Primatengattung Chlorocebus (Grüne Meerkatzen)	Robert Koch-Institut, ZBS 5 Stammsammlung

2.7 Virusstämme

Virus	Titer	Bezugsquelle
Influenza-A-Virus (H1N1/pdm09 A/Michigan/45/2015)	$5,62 \times 10^5$ TCID ₅₀ /ml (auf MDCK)	Robert Koch-Institut, Nationales Referenzzentrum für Influenzaviren, Stammsammlung
Marburg virus Musoke	$1,05 \times 10^6$ TCID ₅₀ /ml (auf MoKi)	Robert Koch-Institut, S4 Stammsammlung
Rekombinantes Lentivirus (Lenti-SV40T)	10^6 CFU/ml	ABM; G256-GVO-ABM
Zaire Ebolavirus GFP	$8,7 \times 10^6$ pfu/ml	Robert Koch-Institut, S4 Stammsammlung
Zaire Ebolavirus Makona C05 (GIN/2014/Gueckedou)	$2,94 \times 10^7$ TCID ₅₀ /ml (auf MoKi)	Robert Koch-Institut, S4 Stammsammlung

2.8 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Absaugsystem Integra Biosciences™ Vacusip	Integra Biosciences™
Applied Biosystems™ 7500, Real-Time PCR System	Applied Biosystems®
Brutschrank CB150 / CB160	Binder
CoolCell LX, BCS-405	Biocision
Cytoflex S Durchflussszytometer	Beckman Coulter
Durchlicht-Inversionsmikroskop EVOS™ XL Core	Life Technologies
Elektrophorese-Netzgerät ST504	Gibco-BRL
EVE™ Automatisierter Zellzähler	NanoEnTek

Bezeichnung	Hersteller
Fledermauskasten	Kugelbunt-Shop
Fledermausvolieren	Volierenbau Genge
Fledermauswaage Micro Line (100 g)	Pesola
Fledermauswaage Micro Line (60 g)	Pesola
Fluoreszenzmikroskop Evos™ FL	Life Technologies
Geldokumentation Gel Doc™ XR+	Bio-Rad
Gelelektrophorese-System Horizon 58	Biometra GmbH
Genetic Analyzer 3500xL Dx	Applied Biosystems®
HiSeq 1500 (NGS)	Illumina®
IATA <i>CryoShipper</i>	MVE
iButton Temperaturlogger	Maxim Integrated
Konfokales Laserscanning Mikroskop LSM 780	Zeiss
Kryokonservierungsbehälter BIOSAFE®	Cryotherm®
Mikrozentrifuge 5424 R	Eppendorf
Multipette® E3x	Eppendorf
NextSeq 550 (NGS)	Illumina®
Qubit™ 3.0 Fluorometer	Invitrogen™
Sicherheitswerkbank HERAsafe KSP 18	Thermo Scientific
Sicherheitswerkbank MARS 1500	LaboGene ApS
Thermoblock ThermoMixer® C	Eppendorf
Thermocycler peqSTAR	Peqlab
TissueLyser II	Qiagen
Ultrazentrifuge Optima™ XPN-100	Beckman Coulter
Vortex-Genie® 2	VWR
Wasserbad VWB12	VWR
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf
Zentrifuge Heraeus™ Multifuge™ X3R	Thermo Scientific

2.9 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller	Produktnummer
2 ml Spritze Injekt® mit Luer Lock	B. Braun	4606701V
24-well-Platte (Nunclon™ Delta)	Thermo Fisher Scientific	142485
6-well-Platte (BioCoat™ Kollagen I-beschichtet)	Corning®	356400
6-well-Platte (Nunclon™ Delta)	Thermo Fisher Scientific	140685
8 mm PYREX™ Klonierungszyylinder	Fisher Scientific	09-552-21
96-well-Platte (V-bottom)	Corning®	3897

Bezeichnung	Hersteller	Produktnummer
Abstrichtupfer FLOQSwabs™ Mini Tip	Copan	518CS01
Atemschutzmaske FFP3 mit Ventil	Clean Breath	5804
Bisschutzhandschuhe Heavy Duty-Kevlar	Wisent	20606983
Bisschutzhandschuhe Sharpsmaster HV™	HexArmor	7082
Combitips advanced (10 ml)	Eppendorf	E-6406
Deckgläser (12 mm Durchmesser)	Carl Roth	P231.1
Desinfektionsmittel terralin® protect	Schülke & Mayr GmbH	181604
Desinfektionsmittel Virkon™ S (5 g Tabletten)	LANXESS Deutschland GmbH	
Fledermausbeutel	Ecotone	W25
Fledermausfangnetz (Mist Net 716/6P)	Ecotone	716/6 P
Hygienemasken	VWR	113-0716
Kanüle Sterican® Gr. 18	B. Braun	4657683
Kryoröhrchen (2 ml)	Sarstedt	72.694.006
Neoprenhandschuhe NeoTouch®	Ansell Health Care	25-201
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging	PM-996
Petrischale (35 x 10 mm)	Corning®	430588
Petrischale (94 x 15 mm)	Brandt	452005
Phase Lock Gel™ Heavy Röhrchen	Quantabio	733-2478
Reagenzreservoir (50 ml)	VWR	613-1184P
Serologische Pipetten 10 ml	VWR	612-3700
Serologische Pipetten 25 ml	VWR	612-3698
Serologische Pipetten 5 ml	VWR	612-3702
Serologische Pipetten 50 ml	VWR	612-3696
Skalpell Cutfix™ (Nr. 21)	B. Braun	5518075
Ultrazentrifugenröhrchen Thinwall Ultra-Clear™; 38,5 ml	Beckman Coulter	344058
Vitaminpaste Nutri-Cal®	Dechra Veterinary Products	alb11102
Zellkulturflaschen 175 cm ² EasYFlask™ (Nunc™ Delta)	Thermo Fisher Scientific	10545131
Zellkulturflaschen 25 cm ² (BioCoat™ Kollagen I-beschichtet)	Corning®	356484
Zellkulturflaschen 25 cm ² EasYFlask™ (Nunc™ Delta)	Thermo Fisher Scientific	10232771
Zellkulturflaschen 75 cm ² (BioCoat™ Kollagen I-beschichtet)	Corning®	356485

Bezeichnung	Hersteller	Produktnummer
Zellkulturflaschen 75 cm ² EasYFlask™ (Nunc™ Delta)	Thermo Fisher Scientific	10538931
Zellschaber (240 mm)	TPP	99002
Zellschaber (300 mm)	TPP	99003
Zellsieb EASYstrainer™ (100 µm)	Greiner Bio One	542000
Zellsieb EASYstrainer™ (40 µm)	Greiner Bio One	542040
Zellsieb EASYstrainer™ (70 µm)	Greiner Bio One	542070
Zentrifugalfilter Vivaclear MINI 0,8 µm PES	Sartorius	VK01P042
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Sarstedt	62.554.502
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Sarstedt	62.547.274

2.10 Software

Anwendung	Software
Bildbearbeitung	Photoshop CS6 Extended (Adobe)
Durchflusszytometrie	CytExpert 2.1 (Beckman Coulter)
Geldokumentation	Image Lab 6.0 (Bio-Rad)
Graphiken und Statistik	Prism 8.4.0 (GraphPad)
Graphiken	Powerpoint 2010 (Microsoft)
Konfokale Mikroskopie	Zen 2.3 SP1 FP3 64 Bit Black (Zeiss)
Literaturverwaltung	EndNote X9 (Clarivate Analytics)
Real-Time PCR Software	7500 Software v2.3 (Applied Biosystems®)
Sequenzanalysen	Geneious 11 (Biomatters)
Tabellenkalkulation	Excel 2010 (Microsoft)
Textverarbeitung	Word 2010 (Microsoft)

3 Methoden

3.1 Fangen von Fledermäusen an der Elfenbeinküste

Fledermäuse der Art *M. condylurus* wurden mit Japannetzen (Ecotone) an einem Haus im Dorf Koffikro an der Elfenbeinküste (Geografische Koordinaten: N 05° 19.340'; W 003° 49.431') gefangen. Im Anschluss wurden die Tiere in Baumwollbeuteln zum LANADA Institut (Laboratoire National d'Appui au Développement Agricole) in Bingerville gebracht, wo sich sowohl die Käfiganlage für die Langzeithaltung der Fledermäuse befand, als auch die Organentnahme für die Etablierung der Primärzellkulturen erfolgte. Die Genehmigung zum Fangen, zur Haltung und zur Euthanasie der Fledermäuse wurde vom LANADA ausgestellt (No.05/virology/2016) und erfolgte entsprechend der Vorgaben des Ethik-Komitees des LANADA Instituts und des Nationalen Ethik-Komitees für Forschung. Die Besitzer des Hauses im Dorf Koffikro und der Dorfvorstand hatten dem Fangen der Fledermäuse zugestimmt.

3.2 Langzeithaltung und Beprobung von Fledermäusen an der Elfenbeinküste

Für die Konstruktion der notwendigen Voliere für die Langzeithaltung wurden zunächst modulare Aluminiumelemente (Volierenbau Genge) an die Elfenbeinküste transportiert. Vor Ort wurde dann eine Hauptvoliere mit 5 m x 4 m und eine kleinere Quarantänevoliere mit 3 m x 2 m konstruiert. Hier sollten, im Falle von Erkrankungen, Tiere separiert werden können. Die Hauptvoliere und die Quarantänevoliere wurden dabei innerhalb eines überdachten Außenkäfigs konstruiert (Anhang, Abbildung 1A), um die Fledermäuse während der Langzeithaltung vor Wildtieren und Wetter zu schützen. Der Innenraum der Volieren wurde für die Ruhephasen der Tiere mit Fledermauskästen und zur Verhaltensanreicherung (*Enrichment*) mit Tüchern und Pflanzen artgerecht ausgestaltet. Alle Fledermäuse wurden mittels PCR negativ auf Filoviren getestet. Die Ernährung der Fledermäuse in Gefangenschaft erfolgte mit den

Larven des Mehlkäfers (*Tenebrio molitor*), die auch als Mehlwürmer bezeichnet werden (Abbildung 7A). Verweigerten die Tiere die Nahrungsaufnahme und kam es innerhalb der ersten drei Tage zu einem Gewichtsverlust von mehr als 25 % vom initialen Körpergewicht, so wurden die Tiere in das Dorf Koffikro zurückgebracht und freigelassen. Um während der Langzeithaltung eine möglichst ausgewogene Ernährung der Tiere zu gewährleisten, wurden die Mehlwürmer vor der Verfütterung an die Fledermäuse mit frischem Obst und Gemüse gefüttert und die Fledermäuse mit der Vitaminpaste Nutri-Cal® (Dechra Veterinary Products) zugefüttert. Der Gesundheitszustand und das Gewicht jedes Tieres wurde täglich überwacht (Abbildung 7B), wobei Tierpfleger des LANADA Instituts diese Arbeiten unterstützt haben. Für die Differenzierung der Fledermäuse wurde jedes Tier mit einem individuellen Strichcode auf dem Rücken markiert (Abbildung 7C), was essentiell für die Dokumentation des Gesundheitszustands und die Beprobung war.

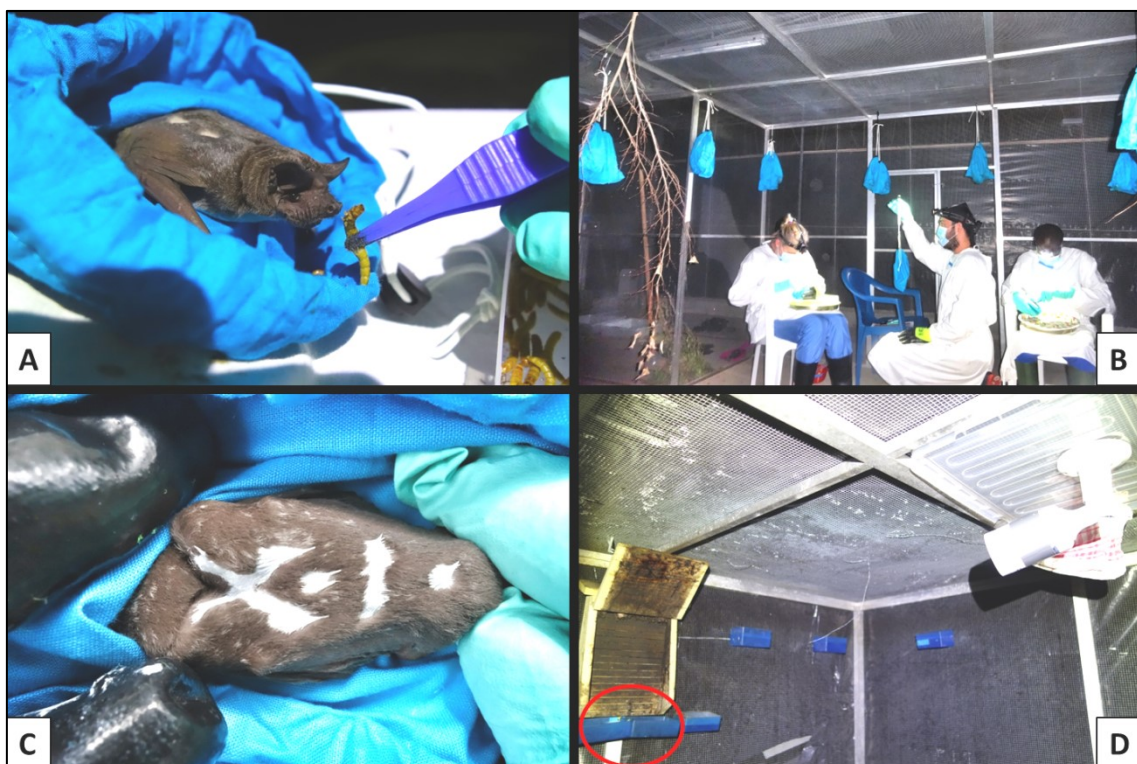


Abbildung 7: Fütterung, Wiegen, Markierung und Beprobung von Fledermäusen an der Elfenbeinküste

A: Handfütterung von *M. condylurus*-Fledermäusen mit Mehlwürmern; B: Tägliche Überprüfung von Gewicht und Habitus der Fledermäuse; C: Individuelle Markierung auf dem Rücken einer Fledermaus; D: Fledermauskasten mit Urin-Auffangbehälter für die Beprobung (rote Markierung).

Unterhalb der Schlafplätze der Fledermäuse (Fledermauskästen) wurden Kunststoffbehälter zum Auffangen des Urins installiert (Abbildung 7D, rote Markierung). Die Menge an ausgeschiedenem Urin war bei Fledermäusen gering. Als geeignetste Zeit für die Probennahme stellte sich die Zeit kurz nach Sonnenaufgang um 7 Uhr heraus, da hier die größte Ausscheidungsmenge zu beobachten und der Urin noch nicht ausgetrocknet war. Am Vorabend der Probennahme wurde der Urin-Auffangbehälter gründlich gereinigt und desinfiziert. Der Urin wurde einmal pro Woche (freitags) mit Hilfe eines Abstrichtupfers aufgenommen und als gepoolte Probe in PBS mit 1 % Albumin Fraktion V und 1 x *Antibiotic-Antimycotic* (Transportpuffer) bei -80°C eingefroren. Die Gewichtskontrolle der Fledermäuse wurde ebenfalls einmal pro Woche (donnerstags) mit der Probennahme von individuellen Oralabstrichen der Tiere verbunden, welche ebenfalls in Transportpuffer eingefroren wurden. Der Transport der gefrorenen Proben nach Deutschland wurde in einem IATA *CryoShipper* (MVE) vorgenommen. Die Kühlkette wurde bis zur Probenpräparation aufrecht erhalten.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Kultivierung von Zellen

Alle in dieser Doktorarbeit verwendeten Fledermaus-Primärzellkulturen und Zelllinien und die in Abschnitt 2.6 genannten Human- und Affenzelllinien wurden bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Bei der in Abschnitt 4.5 beschriebenen Temperaturstudie wurden ausgewählte Zellkulturen darüber hinaus bei 27°C und 42°C kultiviert. Wenn nicht anders beschrieben, wurden zellkulturbehandelte Platten und Flaschen mit Nunclon® Delta-Oberfläche (Nunc) verwendet. Für die Kultivierung von MoSp Prim-Zellen und HEK293ΔNPC1-Zellen wurden BioCoat™ Kollagen I-beschichtete Platten und Flaschen (Corning) verwendet. Den Kulturmedien wurde 15 % FBS zugesetzt, wobei für Infektionsversuche im S4-Labor der Anteil an FBS auf 5 % reduziert wurde, um ein Überwachsen der Zellen zu vermeiden. Als Kulturmedium kam für MoLi Prim-Zellen das Leberzellkulturmedium (William's E Medium, GlutaMAX™ Supplement,

5 % / 15 % FBS, 2 x *Antibiotic-Antimycotic*) und für alle anderen Fledermauszellkulturen das Fledermauszellkulturmedium (DMEM / F12, 5 % / 15 % FBS, 2 x *Antibiotic-Antimycotic*) zum Einsatz. Für Vero UNC-, HeLa-, HEK293- und HEK293ΔNPC1-Zellen war das Kulturmedium wie folgt zusammengesetzt: DMEM mit 5 % / 15 % FBS, 2 mM Glutamin und 100 U / ml Penicillin-Streptomycin (siehe 2.2). Je nach Zellkultur und Zelldichte wurden die Zellen beim Passagieren im Verhältnis 1:2 bis 1:20 umgesetzt. Dafür wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen und anschließend 3 min mit einer 0,25 %igen Trypsin-EDTA Lösung (Sigma-Aldrich) bei 37°C inkubiert. Waren die Zellen zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig abgelöst, wurde ergänzend ein Zellschaber (TPP) verwendet. Nach dem Abzentrifugieren bei 350 g für 3 min wurden die Zellen mit frischem Medium in eine neue Platte bzw. Zellkulturflasche passagiert.

3.3.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl und Viabilität von Zellkulturen wurde unter Verwendung des automatisierten Zellzählers EVE™ (NanoEnTek) nach Herstellerangaben bestimmt [265].

3.3.3 Etablierung von Primärzellkulturen

Um unabhängig von *In-vivo*-Experimenten mit *M. condylurus* Untersuchungen zur Rolle dieser Fledermausart als mögliches Reservoir von Ebolaviren durchführen zu können, waren Zellkulturen notwendig. Die biologischen Eigenschaften und der genetische Hintergrund von Primärzellen spiegelt dabei im Gegensatz zu immortalisierten Zellen besser die *In-vivo*-Situation wider [266]. Daher stand die Verwendung von Primärzellen im Fokus der *In-vitro*-Experimente zur Untersuchung von Virus-Wirts-Interaktionen.

Für die Etablierung von Primärzellkulturen wurden unabhängig von der in Abschnitt 3.2 beschriebenen Langzeithaltung 23 weitere Fledermäuse der Art *M. condylurus* an der Elfenbeinküste gefangen und euthanasiert: Entsprechend der Tierschutzbestimmungen wurden die Tiere zunächst mit Isofluran

(cp-pharma) anästhesiert und dann durch Dekapitation getötet. Die Organe wurden aseptisch entnommen und in 2 ml Kryoröhrchen überführt, in denen sich je 1 ml *RecoveryTM Cell Culture Freezing Medium* (Gibco) befand. Unmittelbar nach jeder Nekropsie wurden die Organe mit Hilfe einer *CoolCell LX* (Biocision) auf -80°C (1°C/min) eingefroren und in einem *IATA CryoShipper* an das Robert Koch-Institut (RKI, Berlin, Deutschland) transportiert.

Eine einzelne europäische Fledermaus der Art *Nyctalus noctula* wurde im Juni 2017 in Berlin verstorben aufgefunden und an das Leibniz Institut für Zoo- und Wildtierforschung (IZW) gebracht. Hier wurde das Tier *in toto* bei 4°C zwischengelagert und noch am gleichen Tag dem RKI für die Etablierung von Zellkulturen zur Verfügung gestellt.

Alle folgenden Schritte zur Etablierung der Primärzellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die gefrorenen Organe wurden zunächst in einem Heizblock bei 37°C aufgetaut und in einer Petrischale (Brand) mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) mit 1x *Antibiotic-Antimycotic* (Gibco) gewaschen. Nach der Prozessierung der Organe wurden, außer bei den Trachea-Zellkulturen, je 5×10^5 Zellen pro Well in für Zellkultur behandelte 6-well-Platten (Nunc) bzw. BioCoatTM Kollagen I-beschichtete Platten (Corning) eingesät und bei 5 % CO₂ und 37°C in einem befeuchteten Brutschrank inkubiert. Innerhalb der ersten 72 h wurde die Bewegung der Zellkulturplatten vermieden. Danach wurde die Zellvermehrung täglich beobachtet und an jedem zweiten Tag das Medium gewechselt. Beim Erreichen von 90 %iger Konfluenz wurden die Zellen expandiert und zur Langzeitlagerung eingefroren. Die Etablierung der Primärzellkulturen wurde im Detail in der zugehörigen Publikation (Anhang 7.2, A) beschrieben [267].

3.3.4 Einfrieren von Zellen

Für spätere Experimente erfolgte die Kryokonservierung von Fledermausprimärzellen- und Zelllinien. Dafür wurden die Zellen zunächst wie in 3.3.1 beschrieben trypsiniert, anschließend in 90 % fetalem Rinderserum (FBS, Biochrom) und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma) resuspendiert und mit Hilfe einer *CoolCell LX* (Biocision) auf -80°C (1°C/min) eingefroren. Am

nächsten Tag wurden die eingefrorenen Zellen für die Langzeitlagerung in einen *BIOSAFE® 420* (Cryotherm®) in die Gasphase von Flüssigstickstoff transferiert.

3.3.5 Immortalisierung durch lentivirale Transduktion von SV40T

Einige ausgewählte Zellkulturen wurden durch Transduktion des großen T-Antigens von SV40 unter Verwendung eines rekombinanten Lentivirus (G256-GVO-ABM, ABM) nach den Angaben des Herstellers immortalisiert [268]. Anstelle von Polybrene wurde die Effizienz der lentiviralen Transduktion mit Hilfe des *ViraDuctin™ Lentivirus Transduction Kits* (Cell Biolabs) oder mit Hilfe des *TransDux MAX™ Kits* (SBI) verstärkt. Die Primärzellen wurden für neun Stunden mit einer MOI von 1 infiziert und die positive Transgenexpression durch konfokale Mikroskopie bestätigt.

3.3.6 Klonierung von Zellen

Um zu gewährleisten, dass eine Zelllinie konsistente und reproduzierbare Charakteristika aufwies, wurde eine Klonierung vorgenommen. Dafür wurden die Zellen zunächst auf eine 6-well-Zellkulturplatte (Nunc) ausgesät und eine einzelne Zelle unter Verwendung eines 8 mm PYREX™ Klonierungszyinders (Fisher Scientific) isoliert und kloniert.

3.3.7 Konfokale Mikroskopie

Während bei der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie die Probe von einem Lichtstrahl zur Gänze beleuchtet wird, wird bei einem konfokalen Mikroskop die Probe punktwise abgetastet. Durch die punktuelle Anregung von Fluoreszenz wird die Entstehung von Streulicht aus den umliegenden Bereichen minimiert. Zusätzlich befindet sich vor dem Detektor die sog. konfokale Blende (*Pinhole*), welche Licht von Objektpunkten außerhalb der Fokusebene ausblendet [269]. Durch Reduktion des Streulichtanteils wird in der konfokalen Mikroskopie eine erhöhte Tiefenschärfe und Kontraststeigerung erreicht.

Die Deckgläser für die Mikroskopie einiger Primärzellen mussten zunächst mit Kollagen Typ I beschichtet werden, da einige Zellen nicht auf unbeschichteten Glasoberflächen zu wachsen vermochten. Dafür wurden die Glasdeckgläser zunächst für eine Stunde mit einer 0,01 %igen Lösung von Rattenschwanz Kollagen Typ I (Sigma-Aldrich) bei Raumtemperatur beschichtet. Vor der Verwendung wurden die Deckgläser anschließend zweimal mit PBS gewaschen.

Für die Untersuchung mittels konfokaler Mikroskopie wurden die Zellen auf Glasdeckgläsern bzw. auf Kollagen I-beschichteten Glasdeckgläsern eingesät und über Nacht bei der Wachstumstemperatur der jeweiligen Zellkultur und 5 % CO₂ inkubiert. Nach dem Wachstum über Nacht wurden die Zellen gewaschen und für 15 min mit 4 % Paraformaldehyd (PFA, Carl Roth) fixiert. Bei infizierten Zellen wurde die Well-Platte mit den Glasdeckgläsern zur Fixierung für 24 h in 4 % Paraformaldehyd (PFA, Mophisto) versenkt und am Folgetag entsprechend der SOPs des S4-Labors ausgeschleust. Die Fixierung wurde für 15 min mit einer 0,3 M Glycinlösung in PBS (pH 7,4) und dreimaligem Waschen mit PBS gequenchet. Anschließend wurden die Zellen für 30 min mit einer 0,1 %igen Triton® X 100-Lösung (Carl Roth) in PBS permeabilisiert. Darauf folgend wurden die Zellen mit einer 0,1 %igen Tween® 20-Lösung (Carl Roth) in PBS (PBST) gewaschen und 30 min mit 1 % Albumin Fraktion V (Carl Roth) in PBST geblockt (Blockpuffer). Die Inkubation mit dem Primärantikörper bzw. dem Isotypkontrollantikörper erfolgte bei 4°C über Nacht. Für Färbungen des Aktin-Zytoskeletts erfolgte eine Inkubation für 30 min mit einer 100 nM Lösung von *Actistain 555 Phalloidin* (PHDH1-A, Cytoskeleton). Nach intensivem Waschen wurden die Zellen 60 min mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Zum Eindecken der Proben mit gefärbtem Aktin-Zytoskeletts wurde doppelt destilliertes Wasser (ddH₂O) verwendet, während für alle anderen Proben ROTI® Mount FluorCare DAPI (Carl Roth) zum Einsatz kam. Letzteres besaß Anti-Fading-Eigenschaften und sorgte für eine Gegenfärbung der DNA mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI). Für die mikroskopische Analyse wurde ein konfokales Laserscanning Mikroskop (Zeiss LSM 780) verwendet, wobei für den Vergleich der NPC1-Rezeptor-Expressionslevel identische

Mikroskopeinstellungen für alle Proben vorgenommen und jeweils 20 zufällige Bereiche auf jedem Deckglas untersucht wurden.

3.3.7.1 Charakterisierung der NPC1-Rezeptor-Expressionslevel

Um die NPC1-Rezeptor-Expressionslevel mit konfokaler Mikroskopie zu charakterisieren, wurde die Zellen wie in Abschnitt 3.3.7 beschrieben vorbereitet. Für die Mikroskopie von MoTes Prim-, MoLyN Prim-, MoBra Prim-, MoSp Prim-, MoMu Prim- und MoSk Prim-Zellen wurden die Glasdeckgläser zunächst mit Kollagen Typ I beschichtet. Alle anderen Zellkulturen konnten direkt auf Glasdeckgläsern wachsen. Als Primärantikörper fungierte ein Maus anti-Human-NPC1-Antikörper (ab55706, abcam) und als Isotypkontrolle ein Maus-Isotypkontrollantikörper (NB600-986, Novus Biologicals), wobei beide Antikörper 1:800 in Blockpuffer verdünnt wurden. Als Sekundärantikörper wurde Esel anti-Maus IgG Alexa Fluor® 647 (ab150111, abcam) verwendet, welcher 1:1000 in Blockpuffer verdünnt wurde.

3.3.7.2 Nachweis von SV40T-immortalisierten Zellen

Der Nachweis von SV40T-immortalisierten Zellen erfolgte unter Verwendung des monoklonalen Maus anti-SV40T-Ag-Antikörpers (sc-147, Santa Cruz Biotechnology) als Primärantikörper. Als Isotypkontrolle wurde der Maus-Isotypkontrollantikörper (Novus Biologicals) verwendet. Beide Antikörper wurden 1:800 in Blockpuffer verdünnt. Als Sekundärantikörper wurde Ziege anti-Maus IgG Alexa Fluor 488 (115-545-003, Dianova) verwendet, welcher 1:1000 in Blockpuffer verdünnt wurde.

3.3.7.3 Nachweis von EBOV-infizierten Zellen

Für den Nachweis von EBOV-infizierten Zellen erfolgte eine Inkubation mit dem Primärantikörper Maus anti-EBOV-NP (ABIN5506751, antibodies-online.com). Als Isotypkontrolle wurde der Maus-Isotypkontrollantikörper (Novus Biologicals) verwendet, wobei beide Antikörper 1:1000 in Blockpuffer verdünnt wurden. Als Sekundärantikörper fungierte der in 3.3.7.2 beschriebene

Ziege anti-Maus IgG Alexa Fluor 488-Antikörper, welcher ebenfalls 1:1000 in Blockpuffer verdünnt wurde.

3.3.8 Nachweis von EBOV-GFP-infizierten Zellen

EBOV-GFP-infizierte Zellen konnten mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Evos™ FL im Monolayer identifiziert werden, da in den Zellen GFP (Grün Fluoreszierendes Protein) gebildet wurde.

3.3.9 Durchflusszytometrie zur Charakterisierung der NPC1-Rezeptor-Expressionslevel

Bei der Durchflusszytometrie fließen die zu untersuchenden Zellen einzeln hintereinander durch einen engen Messkanal. Nach Anregung erfasst eine Reihe von Sensoren Licht, welches von den Zellen gebrochen oder emittiert wird. Dadurch können große Zellpopulationen hinsichtlich Größe und Morphologie der Zellen charakterisiert werden und eine quantitative Bestimmung von Oberflächenmolekülen oder intrazellulären Proteinen durch den Einsatz von fluoreszenzmarkierten Antikörpern vorgenommen werden. Für die Analyse der NPC1-Expression mittels Durchflusszytometrie wurden 1 Mio Zellen pro Well von den zu untersuchenden Zellen zunächst in eine 96-well-Mikrotiterplatte mit V-Boden transferiert. Zunächst wurden die Zellen in der Mikrotiterplatte bei 500 g für 3 min pelletiert, mit PBS gewaschen und eine Vitalfärbung vorgenommen. Hierzu wurde der rekonstituierte Fluoreszenzfarbstoff aus dem *Live/Dead™ Fixable Violet Dead Cell Stain Kit* (Thermo Fisher) 1:100 in PBS verdünnt, 100 µl pro Well zugegeben und 30 min bei 4°C im Dunkeln mit den Zellen inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 2 % FBS in PBS gewaschen und 20 min bei 4°C mit 4 % PFA fixiert. Nach erneutem zweimaligen Waschen mit PBS wurden die Zellen für 30 min bei Raumtemperatur mit 0,1 % Triton® X 100 in PBS permeabilisiert. Nach Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur mit Blockpuffer wurden die Zellen über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper bzw. mit dem Isotypkontrollantikörper inkubiert, wobei beide zuvor 1:100 in Blockpuffer verdünnt wurden. Nach zweimaligem Waschen mit PBST erfolgte die

Inkubation für 60 min bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper, welcher 1:250 in Blockpuffer verdünnt wurde. Nach erneutem zweimaligen Waschen mit PBST wurden die Zellen in FACS-Puffer (PBS mit 2 % FBS; 1 mM EDTA; 0,1 % Natriumazid; pH 7,4) resuspendiert und die Messungen mit einem Cytoflex S Durchflusszytometer (Beckman Coulter) durchgeführt. Dabei wurden jeweils drei Proben pro Zellpopulation analysiert und das gesamte Experiment zweimal für alle Zellen wiederholt. Insgesamt wurden 40.000 Ereignisse pro Well im Durchflusszytometer gemessen.

3.3.10 Infektion von Zellen mit Filoviren im S4-Labor

Alle Infektionsversuche mit Filoviren wurden im Hochsicherheitslabor des Robert Koch-Instituts unter Einhaltung der festgelegten Standardarbeitsanweisungen (SOPs) durchgeführt. Außer mit den in Tabelle 6 angegebenen Fledermauszellkulturen wurden die Infektionsversuche mit den in Abschnitt 2.6 aufgeführten Zelllinien durchgeführt. Die zu infizierenden Zellen wurden 24 h vor der Infektion auf zellkulturbehandelte 6-well-Platten eingesät, so dass sie bei Infektion 90 % konfluent waren. Alle Infektionen erfolgten für die Dauer von einer Stunde, wobei für die Infektionen mit EBOV 0,6 TCID₅₀/Zelle und für die Infektionen mit MARV 0,02 TCID₅₀/Zelle eingesetzt wurden. Die Infektionen mit EBOV-GFP wurden mit einer MOI von 0,1 vorgenommen. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit 3 ml PBS pro Well gewaschen und schließlich 3 ml Zellkulturmedium zugegeben.

3.3.11 Virustitration

Um die Menge infektiöser Viruspartikel in Zellkulturüberständen beurteilen und mit standardisierten Mengen infizieren zu können, wurden Virustitrationen vorgenommen. Die TCID₅₀ (*Tissue Culture Infectious Dose 50*) bezeichnet die Viruskonzentration, bei der 50 % der inokulierten Zellkulturen infiziert werden. Die Virustitration wurde auf 96-well-Platten in Vierfachbestimmung vorgenommen. Hierfür wurden 5×10^4 MoKi-Zellen pro Well in 100 µl Titrationsmedium (DMEM, 10 % FBS, 2 mM Glutamin, 1 x Penicillin-

Streptomycin) ausgesät. Am Folgetag wurde eine Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-9} von virushaltigem Zellkulturüberstand in Titrationsmedium mit 5 % FBS hergestellt. Im Anschluss wurde das Medium vom Vortag von den Zellen entfernt und 50 µl virushaltiges Medium pro Well für jede Verdünnungsstufe auf die Zellen gegeben. Nach 45 min Inkubation bei 37°C wurden 150 µl Titrationsmedium mit 5 % FBS pro Well hinzugegeben und die Zellen 14 Tage bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Zur Fixierung der infizierten Zellen wurden die Well-Platten für 24 h in 4 % Paraformaldehyd (PFA, Mophisto) versenkt und am Folgetag entsprechend der SOPs des S4-Labors ausgeschleust. Die Färbung von EBOV-infizierten Zellen erfolgte wie in 3.3.7 und 3.3.7.3 beschrieben. Die anschließende Auswertung erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop (EvoS™ FL). Für die Berechnung des Virustiters wurde die Methode nach Spearman und Kärber verwendet [270, 271].

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Bestätigung der Fledermausspezies

Die Bestätigung der Fledermausspezies erfolgte molekular durch Amplifikation mittels PCR (Polymerase-Kettenreaktion), Sequenzierung und BLAST-Analyse eines 241 bp großen Fragmentes auf dem *Cytochrom b*-Gen [272].

3.4.1.1 DNA-Extraktion aus Gewebe

Von dem zu untersuchenden Gewebe wurde mit einem Skalpell ein 30 mg schweres Stück abgeschnitten und in 600 µl PBS transferiert. In einem *TissueLyser II* (Qiagen) erfolgte die Homogenisierung für zweimal 40 s bei 25 Hz. Durch anschließende Zentrifugation über 3 min bei 10.000 g wurden feste Zellbestandteile abzentrifugiert. Die DNA-Extraktion erfolgte aus dem Überstand mit Hilfe des *peqGOLD Viral DNA/RNA Kits* (PEQLAB) nach Herstellerangaben [273]. Die Elution erfolgte in 30 µl ddH₂O.

3.4.1.2 Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Unter Verwendung des Thermocyclers peqSTAR (Peqlab) und des Platinum™ Taq DNA Polymerase Kits (Invitrogen™) erfolgte mit den Primern “Fledermaus-Spezies-FW” und “Fledermaus-Spezies-RV” (siehe 2.4) die Amplifikation eines DNA-Abschnitts auf dem *Cytochrom b*-Gen der Fledermäuse nach dem in Tabelle 1 dargestellten Protokoll.

Tabelle 1: PCR-Protokoll und Cycler-Bedingungen für die Fledermausspezies-PCR

		Cycler-Bedingungen:	
Fledermaus-Spezies-FW (10 µM)	0,75 µl	95°C	10 min
Fledermaus-Spezies-RV (10 µM)	0,75 µl	95°C	30 s
dNTPs (10 mM)	2 µl	55°C	30 s
DNA	5 µl	72°C	30 s
10 x PCR-Puffer (ohne MgCl ₂)	2,5 µl	72°C	5 min
MgCl ₂ (50 mM)	1 µl		
ddH ₂ O	12,8 µl		
Platinum™ Taq DNA-Polymerase (10 U / µl)	0,2 µl		

} 45 x

3.4.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 1,5 %igen Agarosegel. Für dessen Herstellung wurde Agarose (Invitrogen™) in 0,5 x TAE-Puffer (Elektrophoresepuffer) durch Erhitzen geschmolzen, in eine Horizon 58 Gelelektrophoresekommer (Biometra GmbH) gegossen und ein Kamm zur Bildung von Probetaschen eingesetzt. Für die Detektierung der DNA im Agarosegel wurden desweiteren 2 µl *Midori Green Advance DNA Stain* (Nippon Genetics) zugesetzt, welches bei Bindung an Nukleinsäuren und Anregung mit UV-Licht die Detektion der DNA-Fragmente im Gel ermöglichte. Nach dem Aushärten der Agarose wurde das Gel mit 0,5 x TAE-Puffer überschichtet. Die Proben wurden mit dem glycerinhaltigem Ladepuffer *DNA Gel Loading Dye* (Thermo Scientific™) versetzt und in die Probetaschen gefüllt. Als Größenstandard wurde in eine benachbarte Spur die *GeneRuler 100 bp DNA Ladder* (Thermo Scientific™) aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte im elektrischen Feld für 30 bis 45 min bei 90 V. Die

Visualisierung und Dokumentation erfolgte mit Hilfe des Gel Doc™ XR+ (Bio-Rad).

3.4.1.4 Aufreinigung der PCR-Produkte für Sequenzierung nach Sanger

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte unter Verwendung des *High Pure PCR Product Purification Kits* (Roche) nach Angaben des Herstellers [274]. Die Elution erfolgte in 25 µl Elutionspuffer.

3.4.1.5 Quantifizierung der DNA

Vor der Sequenzierung der Proben wurde die Menge an dsDNA mit Hilfe eines Qubit™ 3.0 Fluorometers und des Qubit™ dsDNA HS Assay Kits nach Herstellerangaben bestimmt [275].

3.4.1.6 Sequenzierung von DNA nach Sanger

Die Sequenzierung der DNA-Abschnitte erfolgte nach der Didesoxy-Methode (Kettenabbruchmethode) nach Sanger [276]. Die Sequenzierung wurde mit dem *BigDye™ Terminator v3.1 Kit* (Applied Biosystems™) [277] nach dem in Tabelle 2 dargestellten Protokoll durchgeführt. In getrennten Ansätzen wurden die Primer “Fledermaus-Spezies-FW” und “Fledermaus-Spezies-RV” eingesetzt. Vom Fachgebiet MF2 – Genomsequenzierung des Robert Koch-Instituts wurde die Auftrennung der DNA zur Ermittlung der Sequenz unter Verwendung des *Genetic Analyzers 3500xL Dx* (Applied Biosystems®) vorgenommen. Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit Geneious 11 (Biomatters) und den Abgleich mit der NCBI-Datenbank mittels BLAST.

Tabelle 2: Sequenzierungsansatz und Cyclor-Bedingungen

		Cyclor-Bedingungen:	
Primer	0,5 µl	96°C	2 min
BigDye™ Reaction Mix	1 µl	96°C	10 s
5 x Sequencing Buffer	1,5 µl	55°C	5 s
ddH ₂ O	ad 10 µl	60°C	4 min
DNA	1-4 µl (3-10 ng)	4°C	forever

} 25 x

3.4.2 RNA-Extraktion nach Infektion

140 µl Zellkulturüberstand pro Well wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion in 560 µl AVL Puffer überführt. Nach 10 minütiger Inkubation wurden die Proben in je 560 µl Ethanol absolut überführt und anschließend entsprechend der SOPs aus dem S4-Labor ausgeschleust. Die Extraktion der viralen RNAs erfolgte mit Hilfe des *QIAamp Viral RNA Mini Kits* (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers [278]. Die Elution erfolgte in 50 µl AVE-Puffer.

3.4.3 Reverse Transkriptase quantitative Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)

Die qPCR oder *Real-Time*-PCR beruht auf der konventionellen PCR und führt neben der Amplifikation zu einer Quantifizierung der Nukleinsäuren mit Hilfe einer fluoreszenzmarkierten Sonde. Die Messung der Fluoreszenz der Sonde während der PCR erlaubt die Mengenbestimmung der synthetisierten Amplikons in Echtzeit. Die Quantifizierung der viralen RNAs erfolgte durch RT-qPCR (Applied Biosystems™ 7500) unter Verwendung des *AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kits* (Thermo Fisher). Für alle EBOV-Proben wurden Primer und Sonde verwendet, welche Sequenzen auf EBOV VP30 detektierten (EBOV-FW: ACTCCTACTAATCGCCCGTAAG; EBOV-RV: ATCAGCCGTTGGATTGCT; EBOV-Sonde: FAM-CACCCAAGGACTCGC-MGB) [267]. Für jede PCR-Reaktion wurden 3 µl RNA-Probe zu 22 µl Mastermix gegeben. Dieser enthielt 400 nM FW/RV Primer und 200 nM Sonde, 1 µl *Detection Enhancer*, 1 x RT-PCR Puffer and 1 x RT-PCR Enzymmix. Die Inkubation der Proben erfolgte für 15 min bei 45°C, 10 min bei 95°C gefolgt von 45 Zyklen wie folgt: 15 s bei 95°C und 45 s bei 60°C.

Für alle MARV-Proben wurden Primer und Sonde verwendet, welche Sequenzen auf dem L-Protein von MARV detektierten (siehe 2.4). Der Mastermix enthielt 160 nM MARV-FW, 252 nM MARV-RV und 68 nM MARV-Sonde, während die übrigen Bestandteile des Mastermixes identisch zur EBOV-qPCR waren. Die Inkubation der Proben erfolgte für 15 min bei 45°C, 10 min bei 95°C gefolgt von 45 Zyklen wie folgt: 20 s bei 94°C und 30 s bei 59°C.

Mit Hilfe von EBOV bzw. MARV *in vitro* Transkripten (Konzentrationen von $10\text{-}10^7$ Kopien) wurde eine Standardkurve generiert, um die Kopienzahl der viralen RNAs in jeder Probe aus den gemessenen CT-Werte zu ermitteln. Aus der berechneten Kopienzahl viraler RNAs zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion konnte schließlich eine Virusreplikationskinetik ermittelt werden.

3.4.4 Extraktion und Anreicherung viraler RNAs aus Fledermausproben

3.4.4.1 Auswahl und Spiking der Proben

Die während der Langzeithaltung der Fledermäuse an der Elfenbeinküste gewonnenen Oralabstrich- und Urinproben (siehe 3.2) wurden am RKI bei 37°C in einem Thermoblock aufgetaut und anschließend intensiv im Vortexer behandelt. Für die in 4.1.2 beschriebene metagenomische Studie wurden jeweils 250 µl der individuell für jedes Tier genommenen Oralabstrichproben für jeden Beprobungstag gepoolt und wie in 3.4.4.2 beschrieben weiter bearbeitet. Von den Urinproben wurden jeweils 250 µl verwendet und wie in 3.4.4.3 beschrieben aufgearbeitet. Als Negativkontrollen für die Oralabstrich- und Urinproben wurden jeweils ein steriler Abstrichtupfer in Transportpuffer verwendet. Als Positivkontrollen wurden Proben mit Influenza-A-Virus (*H1N1/pdm09 A/Michigan/45/2015*) gespikt. Wenn nicht anders beschrieben, wurde für alle in Abschnitt 3.4.4 beschriebenen Zentrifugationsschritte die Zentrifuge 5424 R (Eppendorf) verwendet.

3.4.4.2 Ultrazentrifugation

Um die gepoolten Oralabstrichproben für die weitere Bearbeitung aufzukonzentrieren, wurde eine Ultrazentrifugation durchgeführt. In einem 38,5 ml Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman Coulter) wurden die Proben mit PBS aufgefüllt und austariert. Anschließend erfolgte die Ultrazentrifugation in einer Optima™ XPN-100 Zentrifuge (Beckman Coulter) unter Verwendung des Rotors SW32Ti für 90 min bei 68.000 g und 4°C. Im Anschluss wurde der

Überstand entfernt und das Pellet über Nacht bei 4°C in 250 µl 1 x Turbo DNase Puffer (Turbo DNA-free™ Kit) resuspendiert.

3.4.4.3 Klärzentrifugation

Oralabstrich- und Urinproben wurden zur Entfernung von größeren Verunreinigungen bei 17.000 g für 3 min zentrifugiert und der Überstand auf einen Zentrifugalfilter überführt. Um Bakterien und somit bakterielle Nukleinsäuren in der Probe zu reduzieren wurde der Zentrifugalfilter Vivaclear MINI 0,8 µm PES (Sartorius) eingesetzt und die Proben bei 2000 g für 3 min zentrifugiert. In der Literatur wird beschrieben, dass die Menge aller Bakterien in Proben durch diesen Zentrifugalfilter um mehr als 99 % reduziert wurde, wohingegen die meisten Viren den o.g. Filter ungehindert passieren konnten [279]. Nach der Filtration wurde zu den Urinproben je 25 µl 10 x Turbo DNase Puffer gegeben und die Proben über Nacht bei 4°C gelagert.

3.4.4.4 DNase-Verdau I

Zur Entfernung von DNA-Kontaminationen wurden je 5 µl Turbo DNase (Turbo DNA-free™ Kit) zu den Oralabstrich- und Urinproben gegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von je 10 µl DNase Inaktivierungsreagenz und einminütige Inkubation bei Raumtemperatur gestoppt. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 350 g wurde der Überstand für die weitere RNA-Extraktion (3.4.4.5) verwendet.

3.4.4.5 RNA-Extraktion

Die Isolierung der RNA aus den Oralabstrich- und Urinproben erfolgte in einem ersten Schritt mit Hilfe von TRIzol™ LS (Invitrogen™). Zu 250 µl Überstand aus 3.4.4.4 wurden 750 µl TRIzol™ LS gegeben und durch auf und ab pipettieren homogenisiert. Durch das enthaltene Guanidinthiocyanat wurden Zellen und Virionen lysiert und gleichzeitig RNasen inaktiviert [280-282]. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur und 10 min Zentrifugation bei 13.500 g wurde der Überstand in ein *Phase Lock Gel*™ Röhrchen (Quantabio) überführt. Durch Zugabe von je 200 µl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1, Merck), schütteln und

Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur wurde die Phasentrennung initiiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 13.500 g für 15 min befand sich die RNA in der oberen, wässrigen Phase, welche durch das Gel im *Phase Lock Gel*TM Röhrchen von der unteren, organischen Phase mit DNA und Proteinen separiert wurde. Die weitere RNA-Extraktion aus der oberen, wässrigen Phase erfolgte unter Verwendung des *QIAamp Viral RNA Mini Kits* nach den Angaben des Herstellers [278].

3.4.4.6 DNase-Verdau II

Nach der Auftragung des Lysats auf die Säulchen (*QIAamp Viral RNA Mini Kit*) wurden diese, abweichend vom Standardprotokoll des Herstellers, zunächst mit 500 µl 70 %igen Ethanol gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte bei 6000 g für 3 min. Um noch eventuell vorhandene weitere DNA-Kontaminationen zu entfernen, wurde auf den Säulchen ein DNA-Verdau mit je 70 µl RDD Puffer und je 10 µl DNase für 15 min bei Raumtemperatur durchgeführt (*RNase-Free DNase Set*, Qiagen). Die weiteren Waschschriffe erfolgten nach Herstellerangaben (*QIAamp Viral RNA Mini Kit*). Die Elution der RNA erfolgte in 60 µl AVE Elutionspuffer.

3.4.4.7 cDNA-Synthese

Für die Synthese der cDNA aus der extrahierten RNA wurde das *SuperScript*TM *II Reverse Transcriptase Kit* (InvitrogenTM) verwendet. Als Primer kamen K8N Random Primer (siehe 2.4) zum Einsatz [283, 284]. Für alle im folgenden beschriebenen PCRs wurde der Thermocycler peqSTAR (Peqlab) verwendet. Die cDNA-Synthese wurde nach dem in Tabelle 3 dargestellten Protokoll durchgeführt: Wie erkennbar wurde die Reverse Transkriptase erst nach der Denaturierungsphase zugesetzt. Um RNA-Degradation zu vermeiden, wurde dem Ansatz zusätzlich *RNaseOUT*TM *RNase Inhibitor* (InvitrogenTM) beigelegt.

Tabelle 3: PCR-Protokoll und Cyclor-Bedingungen für cDNA-Synthese

		Cyclor-Bedingungen:	
K8N Random Primer (40 µM)	2 µl	95°C	5 min
dNTPs (25 mM)	1 µl	65°C	5 min
RNA	28 µl	4°C	forever
5 x FS-Puffer (First Strand Buffer)	10 µl	42°C	50 min
DTT (0,1 M)	5 µl	70°C	15 min
RNaseOut™	1 µl	4°C	forever
Superscript II (200 U/µl)	2,5 µl		

3.4.4.8 Zweitstrangsynthese cDNA

Für die Zweitstrangsynthese von der ss cDNA wurde die *DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment* (New England BioLabs) und als Primer erneut K8N Random Primer verwendet. Die Zweitstrangsynthese wurde nach dem in Tabelle 4 dargestellten Protokoll durchgeführt: Dabei wurde die Polymerase erst nach der Denaturierungsphase zugesetzt.

Tabelle 4: PCR-Protokoll und Cyclor-Bedingungen für Zweitstrangsynthese cDNA

		Cyclor-Bedingungen:	
K8N Random Primer (40 µM)	2 µl	95°C	2 min
dNTPs (10 mM)	2 µl	4°C	forever
ss cDNA	19 µl		
NEBuffer 2	3 µl		
ddH ₂ O	2 µl		
DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment	1,7 µl	37°C	60 min
		4°C	forever

3.4.4.9 Aufreinigung der ds cDNA

Die entstandene ds cDNA wurde mit Hilfe des *MinElute PCR Purification Kits* (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt [285]. Die Elution erfolgte in 10 µl Puffer EB.

3.4.4.10 Amplifikation der DNA durch Random-PCR

Unter Verwendung des Platinum™ Taq DNA Polymerase Kits (Invitrogen™) und K-Primern (siehe 2.4) [283, 284] wurde eine weitere Amplifikation der erhaltenen DNA nach dem in Tabelle 5 dargestellten Protokoll durchgeführt.

Tabelle 5: PCR-Protokoll und Cyclor-Bedingungen für die Amplifikation der DNA durch Random-PCR

		Cyclor-Bedingungen:		
K-Primer (10 µM)	4 µl	95°C	5 min	1 x
dNTPs (10 mM)	4 µl	95°C	1 min	} 5 x
ds cDNA	5 µl	59°C	1 min	
10 x PCR-Puffer (ohne MgCl ₂)	5 µl	72°C	1 min	
MgCl ₂ (50 mM)	5 µl	95°C	20 s	} 33 x
ddH ₂ O	26 µl	59°C	20 s	
Platinum™ Taq	1 µl	72°C	1 min	
DNA-Polymerase (10 U / µl)		72°C	7 min	1 x
		4°C	forever	

3.4.4.11 Aufreinigung der PCR-Produkte für Next Generation Sequencing (NGS)

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte unter Verwendung des *NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-Up Kits* (Macherey-Nagel) und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt [286]. Die Elution erfolgte in 30 µl Puffer NE.

3.4.5 Next Generation Sequencing (NGS)

Vom Fachgebiet MF2 – Genomsequenzierung des Robert Koch-Instituts wurde die aus Oralabstrich- und Urinproben gewonnene DNA sequenziert. Bei den Oralabstrichproben erfolgte die Sequenzierung über einen NextSeq 550 (Illumina®) unter Verwendung des *NextSeq 500/550 High Output Kits v2.5* (Illumina®). Bei den Urinproben erfolgte die Sequenzierung über einen HiSeq 1500 (Illumina®) unter Verwendung des *HiSeq SR Cluster Kits v4 cBot* und des *HiSeq SBS Kits V4* (Illumina®). In beiden Fällen wurde eine

Single-Read-Sequenzierung mit einer *Read*-Länge von 150 bp auf dem NextSeq 550 und 125 bp auf dem HiSeq 1500 vorgenommen.

3.5 Probenauswahl für NGS und metagenomische Analyse

Die Probennahme begann erst nach ausreichender Gewöhnung der Tiere an die Haltungsbedingungen und erfolgreicher Umstellung auf Mehlwürmer als Nahrungsquelle. Beginnend ab dem 27. April 2017 (Probe Nr. 4) wurden 47 Beprobungstage bis zum 15. März 2018 (Probe Nr. 96) für die metagenomische Analyse ausgewählt, die insgesamt einen Zeitraum von ca. elf Monaten abdeckten (eine Probe pro Woche). Die Proben wurden nach einer zufälligen Reihenfolge bearbeitet (Excel RAND-Funktion), um keinen Bias zuzulassen. Die minimale DNA-Konzentration für die Illumina®-Sequenzierung betrug 2 ng/µl. Für die Oralabstrichproben wurden nach Extraktion und Anreicherung Konzentrationen von 15-30 ng/µl, für die Urinproben Konzentrationen von 19-30 ng/µl für alle Proben erreicht. Die Sequenzierung der Proben erfolgte wie in Abschnitt 3.4.5 beschrieben. Zwei Oralabstrich- und zwei Urinproben (Probe Nr. 16 und 28) wurden mit je 14.500 TCID₅₀ Influenza-A-Virus (*H1N1/pdm09 A/Michigan/45/2015*) gespikt, um die Effizienz der Extraktion und die Anreicherung der viralen RNAs am Ende beurteilen zu können.

3.6 Bioinformatische Methoden

3.6.1 Metagenomische Analyse von Oralabstrich- und Urinproben

Von der Abteilung MF1 – Bioinformatik des Robert Koch-Instituts wurde die bioinformatische Analyse der NGS-Daten vorgenommen. Dabei wurden in einem ersten Schritt zunächst alle *Reads* aus den Sequenzierungsdaten der Oralabstrich- und Urinproben entfernt, bei denen es sich um mögliche *M. condylurus*-Sequenzen handelte. Da es noch keine Vollgenomsequenz von dieser Fledermausspezies gab, wurde eine Datenbank aus den Genomsequenzen von den verwandten Fledermausspezies *Molossus molossus*, *Myotis myotis* und dem Transkriptom von *M. condylurus*

(*BioProject number*: PRJNA506280) erstellt. Durch *Mapping* gegen diese Datenbank erfolgte dann die Entfernung möglicher Wirtssequenzen. In einem weiteren Schritt wurde der Hintergrund der Negativkontrollen entfernt. Dafür wurden zunächst die *Contigs* (*contiguous sequences*) in den Negativkontrollen mit Hilfe des *SPAdes genome assemblers* v3.12.0 [287] assembliert. Im Anschluss wurden ausschließlich *Reads* weiter betrachtet, die nicht gegen die vorher assemblierten *Contigs* der Negativkontrollen *mappten*. Für alle *Mapping*-Vorgänge wurde der *Burrows-Wheeler Aligner* (*BWA-MEM*) verwendet [288]. Die weitere Klassifizierung der *Reads* in den Einzelproben erfolgte mit Hilfe von *Ganon* 0.2.0 [289] durch Abgleich mit der vollständigen *RefSeq*-Datenbank der Virussequenzen [290].

3.6.2 *M. condylurus* NPC1-Sequenz

Im Rahmen einer *M. condylurus* Transkriptom-Studie in der Arbeitsgruppe (BioProject number: PRJNA506280) wurde am RKI die Fledermaus-RNA mit einem Illumina® HiSeq 1500 sequenziert und die *Reads* unter Verwendung des *Oyster River Protocols* (MacManes, 2017) annotiert. Die *Contigs*, welche zu NPC1 annotiert wurden, wurden in Geneious importiert und weiter untersucht.

3.7 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung der Software GraphPad Prism. Für die graphische Darstellung der Virusreplikationskinetik wurden die Messwerte als geometrischer Mittelwert mit geometrischer Standardabweichung abgebildet. Zur Untersuchung der Signifikanz wurde eine zweifache Varianzanalyse (*two-way analysis of variance*, *two-way ANOVA*) mit anschließendem Tukey-Test durchgeführt und p-Werte < 0,05 als statistisch signifikant bewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Langzeithaltung und Virom von *M. condylurus*

4.1.1 Langzeithaltung mit Beprobung der Fledermäuse

Um die Probennahme für die Langzeitstudie zur Ermittlung des Viroms in der Fledermausspezies *M. condylurus* durchzuführen, wurden von April bis Mai 2017 Fledermäuse wie in Abschnitt 3.1 beschrieben im Dorf Koffikro gefangen (Anhang, Abbildung 2) und deren Tauglichkeit für eine Langzeithaltung mit der Futterumstellung auf Mehlwürmer [291] (Anhang, Abbildung 3) untersucht.

Die erfolgreiche Umstellung der Fledermäuse von ihrer natürlichen Ernährung [144] auf Mehlwürmer dauerte vier Wochen: In dieser Zeit mussten die Tiere zunächst individuell per Hand gefüttert werden (Abbildung 7A und Anhang, Abbildung 4). Für einige Tiere war es darüber hinaus in der Anfangsphase notwendig, die Mehlwürmer zu pürieren und über eine 2 ml Spritze (Braun) zu verabreichen (Anhang, Abbildung 5). Von insgesamt 50 gefangenen Tieren konnten 20 Tiere (12 männlich; 8 weiblich) zur selbstständigen Nahrungsaufnahme trainiert und so in die Langzeithaltung von April 2017 bis März 2018 (47 Wochen) aufgenommen werden. Bei der Handfütterung der Tiere wurde der Habitus und das Gewicht jedes Tieres täglich dokumentiert (Abbildung 7B). Alle Tiere zeigten innerhalb der ersten drei bis vier Tage in Haltung aufgrund der Nahrungsumstellung eine Abnahme des Körpergewichts, welches sich jedoch innerhalb der ersten Woche stabilisierte (Anhang, Abbildung 6). Wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben konnte die Spezies für alle gefangenen Tiere durch Sequenzierung eines 241 bp großen Fragmentes auf dem *Cytochrom b*-Gen und anschließende BLAST-Analyse als *M. condylurus* bestätigt werden (Anhang, Abbildung 7).

Innerhalb der Langzeithaltung kam es bei vier Fledermäusen zu Trächtigkeit (Anhang, Abbildung 8). Um die Muttertiere und ihren Nachwuchs vor einem möglichen aggressiven Verhalten anderer Fledermäuse zu schützen, wurde die Quarantänevoliere als Wochenstube eingerichtet und die Tiere von der übrigen Gruppe separiert (Probennahme wurde fortgesetzt). Ein Nachwuchstier verstarb

bereits einen Tag nach der Geburt. Die anderen Nachwuchstiere wurden von den Muttertieren gesäugt, verstarben jedoch schließlich ebenfalls vier bis sechs Wochen nach der Geburt.

Der Gesundheitszustand der Fledermäuse wurde für die gesamte Dauer der Langzeithaltung anhand des Habitus und des Körpergewichts überwacht. Um die Virusausscheidungen mit dem Gesundheitszustand korrelieren zu können, wurde die relative Änderung des Fledermausgruppengewichts in Prozent bezogen auf das Gewicht zu Beginn des Experimentes ermittelt (Abbildung 8, Seite 56 und Abbildung 9, Seite 57; schwarze Kurve). Dabei wurden die vier trächtigen Tiere aus der Kalkulation des relativen Gruppengewichts ausgeschlossen. In den ersten 35 Wochen lag das relative Fledermausgruppengewicht stets über 100 % und stieg bis auf 114 % an. Ab Woche 36 war ein starker Abfall des Fledermausgruppengewichts bis auf 83 % in Woche 42 zu beobachten. In diesem Zeitraum bis Woche 47 verstarben insgesamt 60 % der Tiere (12 Fledermäuse). Erst in Woche 47 erreichte das relative Fledermausgruppengewicht wieder 100 %.

4.1.2 Positivkontrollen für die metagenomische Analyse

Die Proben Nr. 1 bis 3 aus der Langzeithaltung (17.04. bis 25.04.2017) wurden in Zusammenarbeit mit dem Fachgebiet MF1 – Bioinformatik des Robert Koch-Instituts nach dem Spiken von Influenza-A-Virus für die Adaptation und Optimierung des ursprünglichen Gewebeprotokolls für Oralabstrich- und Urinproben verwendet. Die notwendige Sequenziertiefe (*Coverage*) wurde auf 10 Mio *Reads* für die Oralabstrichproben und 50 Mio *Reads* für die Urinproben festgelegt, damit Influenza-A-Virus in beiden Positivkontrollen sicher detektiert werden konnte.

Bei den Oralabstrichproben wurden in den gespikten Positivkontrollen mit Influenza-A-Virus (*H1N1/pdm09 A/Michigan/45/2015*) 62.125 *Reads* (Probe 16) und 99.502 *Reads* (Probe 28) nachgewiesen. Bei den Urinproben wurden in den gespikten Positivkontrollen mit Influenza-A-Virus 34.387 *Reads* (Probe 16) und 1604 *Reads* (Probe 28) detektiert. Damit konnte der *Workflow* zur Präparation und Sequenzierung für alle Proben angewendet werden.

4.1.3 Metagenomische Analyse von Proben von *M. condylurus*

Die folgenden Ergebnisse der bioinformatischen Auswertung und Sequenzzuordnung wurden vom Fachgebiet MF1 ermittelt und lieferten erstmals Einblick in das Virom in Fledermausproben von *M. condylurus*. Bei den Oralabstrichproben wurde innerhalb der 100 Treffer mit der größten *Coverage* der Großteil der *Reads* Viren von Bacteria und Archaea (83 %) zugeordnet. Desweiteren wurden 7 % der *Reads* Viren von Insekten und 1 % einem Algen-infizierenden Virus zugeordnet.

Neben der Positivkontrolle wurden insgesamt 8 % der *Reads* mit Ähnlichkeit zu verschiedenen Vertebraten-infizierenden Viren klassifiziert, die alle den drei Familien *Coronaviridae*, *Adenoviridae* und *Herpesviridae* zugeordnet werden konnten.

Im Folgenden wurde für diese ausgewählten Virusfamilien das zeitliche Auftreten im Verlauf der Langzeithaltung der Fledermäuse untersucht (Abbildung 8). Die einzelnen Datenpunkte entstanden, indem die Summe aller detektierter *Reads* zum jeweiligen Zeitpunkt, die der jeweiligen Virusfamilie zugeordnet werden konnten, gebildet wurde. *Reads* mit Ähnlichkeit zu *Coronaviridae*, *Adenoviridae* und *Herpesviridae* konnten in allen Oralabstrichproben über den gesamten Verlauf der Langzeithaltung der Fledermäuse detektiert werden. Dabei konnten in den Proben 13.548 *Reads* nachgewiesen werden, die der Familie der *Coronaviridae* zugeordnet werden konnten. Insgesamt 16.421 *Reads* wurden mit Ähnlichkeit zu *Adenoviridae* und 26.646 *Reads* mit Ähnlichkeit zu *Herpesviridae* klassifiziert.

Bei der Untersuchung der detektierten *Reads* über die Zeit, konnten für *Corona*- und *Adenoviridae* keine Peaks an Virusausscheidung in den Oralabstrichproben beobachtet werden. Bei den *Herpesviridae* fiel ein Peak in Woche 36 auf. Die Menge an detektierten *Reads* in dieser Probe war ca. 15 x höher als in der Probe mit der geringsten Menge an *Reads* (Woche 15). Auffallend war desweiteren, dass dieser Herpesvirus-Peak am Beginn des Zeitfensters lag, in dem das relative Fledermausgruppengewicht bis auf 83 % abfiel und insgesamt 60 % der Tiere verstarben.

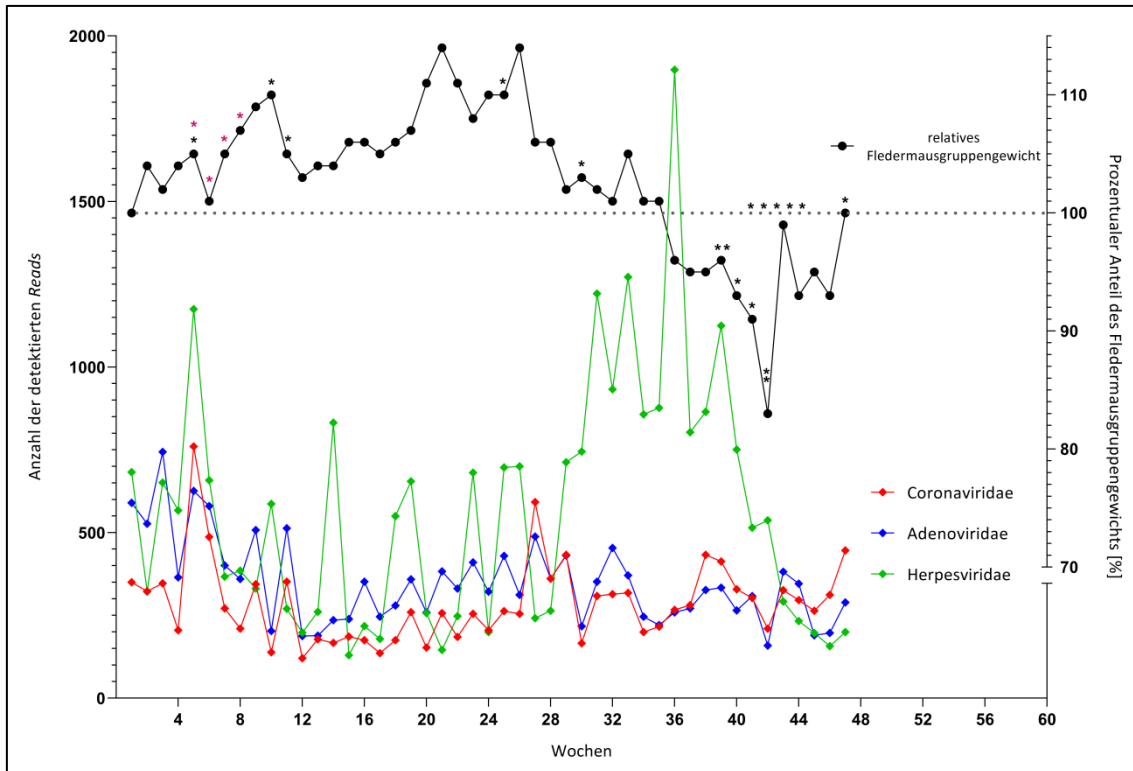


Abbildung 8: Detektierte Virusfamilien in Oralabstrichproben aus Fledermaus-Langzeithaltung

Detektierte Virusfamilien, die Vertebraten infizieren: *Coronaviridae* (rot), *Adenoviridae* (blau) und *Herpesviridae* (grün). Einzelne Datenpunkte stellen die Summe aller detektierte *Reads* zum jeweiligen Zeitpunkt der jeweiligen Virusfamilie dar. Relative Änderung des Fledermausgruppengewichts in Prozent bezogen auf das Gewicht zu Beginn des Experimentes (schwarz). Vier trächtige Tiere von insgesamt 20 Tieren wurden aus der Kalkulation des Gruppengewichts ausgeschlossen. Die gestrichelte Linie kennzeichnet den 100 %-Wert für das relative Fledermausgruppengewicht. * = verstorbene Fledermaus; * = Fledermausgeburt.

Da bei den Urinproben im Vergleich zu den Oralabstrichproben die *Coverage* bei den klassifizierten Treffern stärker abnahm, wurden nur die 60 Virustreffer mit der größten *Coverage* untersucht. Innerhalb dieser bildeten erneut Viren von Bacteria und Archaea mit 90 % den größten Anteil. Neben der Positivkontrolle wurden insgesamt 8 % der *Reads* mit Ähnlichkeit zu verschiedenen Vertebraten-infizierenden Viren klassifiziert, die alle den vier Familien *Genomo*-, *Corona*-, *Adeno*- und *Herpesviridae* zugeordnet werden konnten.

Der prozentuale Anteil von *Reads* mit Ähnlichkeiten zu *Corona*-, *Adeno*-, *Herpes*- und *Genomoviridae* an der Gesamtanzahl der *Reads* betrug 0,02 % (Oralabstrichproben) und 0,004 % (Urinproben).

Analog zu der Analyse der Oralabstrichproben wurde für die Urinproben für diese ausgewählten Virusfamilien das zeitliche Auftreten im Verlauf der Langzeithaltung der Fledermäuse untersucht (Abbildung 9).

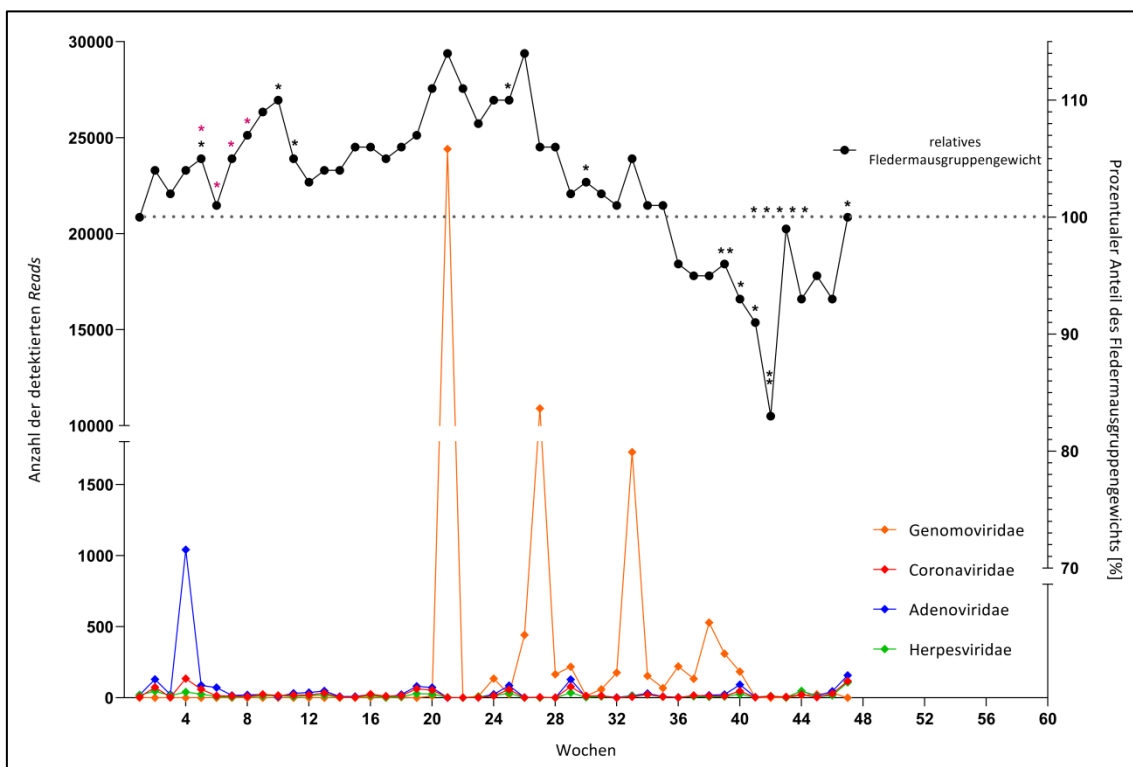


Abbildung 9: Detektierte Virusfamilien in Urinproben aus Fledermaus-Langzeithaltung

Detektierte Virusfamilien, die Vertebraten infizieren: *Genomoviridae* (orange), *Coronaviridae* (rot), *Adenoviridae* (blau) und *Herpesviridae* (grün). Einzelne Datenpunkte stellen die Summe aller detektierten *Reads* zum jeweiligen Zeitpunkt der jeweiligen Virusfamilie dar. Relative Änderung des Fledermausgruppengewichts in Prozent bezogen auf das Gewicht zu Beginn des Experimentes (schwarz). Vier trächtige Tiere von insgesamt 20 Tieren wurden aus der Kalkulation des Gruppengewichts ausgeschlossen. Die gestrichelte Linie kennzeichnet den 100 %-Wert für das relative Fledermausgruppengewicht. * = verstorbene Fledermaus; * = Fledermausgeburt.

Reads mit Ähnlichkeit zu *Coronaviridae*, *Adenoviridae* und *Herpesviridae* konnten in nahezu allen Proben über den gesamten Verlauf der Langzeithaltung der Fledermäuse nachgewiesen werden, wobei die Menge an

detektierten *Reads* auf einem niedrigeren Niveau als bei den Oralabstrichproben war. Nicht nachweisbar waren *Corona*- in Woche 32, *Adeno*- in Woche 28 und *Herpesviridae* in Woche 22, 26 und 27. Bei der Analyse der Urinproben konnten insgesamt 1136 *Reads* der Familie der *Coronaviridae* zugeordnet werden. Insgesamt 2561 *Reads* wurden mit Ähnlichkeit zu *Adenoviridae* und 758 *Reads* mit Ähnlichkeit zu *Herpesviridae* klassifiziert. Während für *Corona*- und *Herpesviridae* keine Viruspeaks im Verlauf der Fledermaushaltung festgestellt werden konnten, trat bei den *Adenoviridae* ein Peak in Woche 4 auf, bei dem die Anzahl der detektierten *Reads* ca. 45 x höher als in Woche 3 war. Auffallend war dabei, dass in diesem Zeitraum vier Fledermäuse trächtig waren: In den Wochen 5 (Fledermaus Nr. 50), 6 (Fledermaus Nr. 35), 7 (Fledermaus Nr. 31) und 8 (Fledermaus Nr. 36) kam es zu Geburten von Fledermäusen in Haltung.

Im Gegensatz zu den Oralabstrichproben konnten in den Urinproben 40.006 *Reads* mit Ähnlichkeit zu der Familie *Genomoviridae* zugeordnet werden, wobei 99,9 % der *Reads* mit Ähnlichkeit zum *Human associated gemykibivirus 2* klassifiziert wurden. Während *Reads* mit Ähnlichkeit zu *Corona*-, *Adeno*- und *Herpesviridae* in nahezu allen Urinproben nachweisbar waren, konnten *Genomoviridae* in 26 % der Proben nicht detektiert werden (Woche 1, 4, 5, 6, 8, 12, 13, 14, 17, 19, 42 und 47). Allerdings waren in Abbildung 9 deutlich vier Peaks für *Genomoviridae* erkennbar (Woche 21, 27, 33 und 38), die in genau dieser Reihenfolge kleiner wurden. Die Menge an detektierten *Reads* in Woche 21 im Vergleich zur Vorwoche war dabei 1878 x höher. Der vierte und kleinste Peak in Woche 38 war nur noch mit einer 4 x höheren Menge an detektierten *Reads* im Vergleich zur Vorwoche verbunden. Lediglich dieser letzte Viruspeak fiel in den Zeitraum, in dem die starke Abnahme des relativen Fledermausgruppengewichts zu beobachten war.

4.2 Untersuchung der NPC1-Rezeptor-Expression in Fledermaus-Primärzellkulturen und -Zelllinien

4.2.1 Etablierung von Primärzellkulturen von *M. condylurus* und *N. noctula*

Insgesamt wurden aus 12 Organen bzw. Geweben von *M. condylurus* Primärzellkulturen etabliert: Niere, Hoden, Lymphknoten, Gehirn, Milz, Flughaut, Brustmuskel, Herz, Lunge, Trachea, Leber und Knochenmark (Tabelle 6) (Anhang, Abbildung 9).

Tabelle 6: Liste der verwendeten Fledermausorgane bzw. -gewebe und der daraus entwickelten Zellkulturen

Fledermausart	Organ/Gewebe	Name der Primärzellkultur	Name der SV40T-immortalisierten Zelllinie	Spontane Immortalisierung
<i>M. condylurus</i>	Niere	MoKi Prim	MoKi*	ja
	Hoden	MoTes Prim	ND	ja
	Lymphknoten	MoLyN Prim	ND	nein
	Gehirn	MoBra Prim	ND	ja
	Milz	MoSp Prim	ND	ja
	Flughaut	MoSk Prim	ND	ja
	Brustmuskel	MoMu Prim	ND	ja
	Herz	MoHe Prim	ND	ja
	Lunge	MoLu Prim	ND	ja
	Trachea	MoTra Prim	ND	ja
	Leber	MoLi Prim	MoLi	nein
	Knochenmark	MoMac Prim	ND	nein
<i>N. noctula</i>	Niere	NyKi Prim	NyKi	ja

Namen der Zellkulturen: Die ersten beiden Buchstaben indizieren die Fledermausspezies (Mo = *Mops condylurus*; Ny = *Nyctalus noctula*). Die darauf folgenden zwei oder drei Buchstaben indizieren das Organ (in Englischer Sprache), aus dem die Zellkultur entwickelt wurde. SV40T-immortalisierte Zelllinien tragen keine weitere Kennzeichnung im Namen. Mit dem Zusatz "Prim" werden Primärzellkulturen bzw. nicht durch SV40T-immortalisierte Zellkulturen indiziert. * = Klonierte Zelllinie; ND = Nicht durchgeführt.

Teile der in 4.2/4.3 und 5.2/5.3 beschriebenen und diskutierten Ergebnisse wurden vorab in [Bokelmann et al., *Utility of primary cells to examine NPC1 receptor expression in Mops condylurus, a potential Ebola virus reservoir*, *PLoS Negl Trop Dis*, 2020] veröffentlicht.

Aus den Nieren der europäischen Fledermaus der Art *N. noctula* wurden ebenfalls Zellkulturen entwickelt, um bei der späteren Interpretation der Versuchsergebnisse Vergleiche mit einer europäischen Fledermaus vornehmen zu können, bei der es sich aufgrund der Verbreitung unmöglich um ein natürliches Reservoir von EBOV handeln kann.

Alle in den Experimenten dieser Doktorarbeit verwendeten Fledermauszellkulturen und die zugehörigen Abkürzungen wurden in Tabelle 6 und Anhang, Abbildung 0 zusammengefasst.

Viele Primärzellkulturen waren heterogen (Tabelle 7; Seite 65) mit einer Vielzahl unterschiedlicher morphologischer Zelltypen, deren Größe und Form variierte (Abbildung 10A). So konnten beispielsweise Zellen mit epitheloider Morphologie, z.B. Nierenzellkulturen, oder auch Zellen mit Fibroblastenmorphologie, z.B. Lungenzellkulturen, beobachtet werden. Einige morphologisch auffällige Zelltypen waren Makrophagen aus Knochenmark (BMDMs) mit deutlich erkennbaren intrazellulären Vesikeln, neuronale Zellen mit dendritenähnlichen Strukturen in Gehirnzellkulturen, vielkernige Zellen in Lymphknotenzellkulturen oder polynukleäre Syncytien in Muskelzellkulturen (Abbildung 10C-F). Andere Primärzellkulturen waren homogen (Tabelle 7) und schienen aus nur einem Zelltyp zu bestehen. Dazu gehörten Zellkulturen aus Lunge, Trachea (Abbildung 10B), Haut und Muskel von *M. condylurus* und die Nierenzellkultur von *N. noctula*.

Eine für Primärzellen typische Verlangsamung des Zellwachstums konnte bei keiner Zellkultur nach 15 Passagen beobachtet werden. Die meisten Primärzellkulturen von *M. condylurus* immortalisierten spontan (Kriterium: Passagenzahl > 15). Fünf der Fledermauszellkulturen (MoTra Prim, MoLu Prim, MoKi Prim, MoHe Prim, MoSp Prim) wurden 35-70 mal passagiert und zeigten dabei keine Veränderungen bezüglich ihrer Wachstumsgeschwindigkeiten. Allerdings war eine Abnahme der Vielfalt an unterschiedlichen Zelltypen in den heterogenen Zellkulturen zu beobachten. So führte beispielsweise das kontinuierliche Passagieren bei MoKi Prim-Zellen zum Entstehen einer morphologisch homogenen aus einer vormals heterogenen Zellkultur (Abbildung 10G und H).

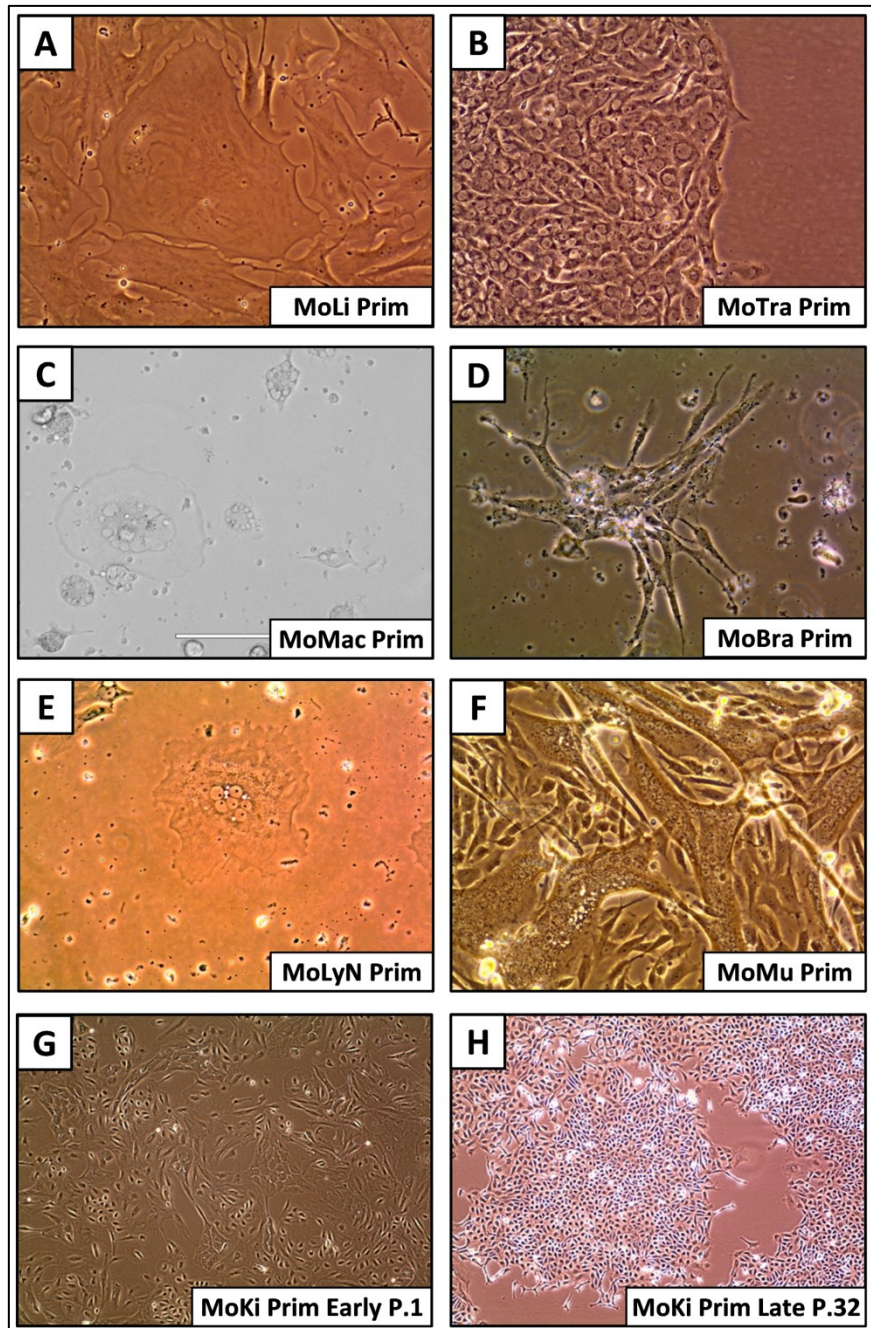


Abbildung 10: Phasenkontrastmikroskopie ausgewählter Primärzellkulturen von *M. condylurus*

A: Heterogene Leberzellkultur mit einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen (MoLi Prim); B: Homogene Tracheazellkultur mit nur einem erkennbaren Zelltyp (MoTra Prim); Auffällige Zelltypen – C: Makrophagen aus Knochenmark (MoMac Prim); D: Gehirnzellen (MoBra Prim); E: vielkernige Lymphknotenzellen (MoLyN Prim); F: polynukleäre Syncytien (MoMu Prim); Primäre Nierenzellen mit unterschiedlichen Passagenzahlen – G: Passage 1 (MoKi Prim Early); H: Passage 32, Abnahme der Vielfalt an unterschiedlichen Zelltypen (MoKi Prim Late); C: 20 x, alle anderen Aufnahmen: 40 x. Mit “Early” wurden Zellen mit wenigen Passagen (< 10), mit “Late” hingegen Zellen mit größerer Anzahl an Passagen (> 10) gekennzeichnet.

Lediglich bei Leber-, Knochenmark- und Lymphknotenzellkulturen konnte keine spontane Immortalisierung beobachtet werden.

4.2.2 Immortalisierung durch lentivirale Transduktion von SV40T und Klonierung

Für *In-vitro*-Experimente mit Filoviren und Fledermauszellen werden überwiegend immortalisierte Zellen verwendet. Um die späteren Versuchsergebnisse mit den Primärzellen mit Ergebnissen in immortalisierten Zellen derselben Spezies vergleichen zu können, wurden drei verschiedene immortalisierte Zelllinien generiert.

MoKi Prim-, MoLi Prim- und NyKi Prim-Zellen wurden durch Transduktion des großen T-Antigens von SV40 unter Verwendung eines rekombinanten Lentivirus immortalisiert (Tabelle 6). Während bei den MoKi Prim- und NyKi Prim-Zellen die Effizienz der lentiviralen Transduktion mit Hilfe des *ViraDuctin™ Lentivirus Transduction Kits* verstärkt wurde, wurde bei MoLi Prim-Zellen das *TransDux MAX™ Kit* verwendet. Die positive Transgenexpression wurde durch Immunfluoreszenz unter Verwendung des monoklonalen Maus anti-SV40T-Ag-Antikörpers und des Ziege anti-Maus IgG Alexa Fluor 488-Antikörpers und anschließender konfokaler Mikroskopie bestätigt (Anhang, Abbildung 10). Beim Vergleich der MoLi-Zellen in Passage vier zu MoLi-Zellen in Passage 11 nach Immortalisierung waren deutliche morphologische Veränderungen erkennbar: MoLi-Zellen in Passage elf wiesen eine reduzierte Größe auf und es waren keine Primärzellen mehr in der Kultur identifizierbar.

Die MoKi-Zelllinie fungierte desweiteren als Referenz für die in 3.3.9 beschriebenen Durchflusszytometrie-Experimente. Um zu gewährleisten, dass diese Zelllinie konsistente und reproduzierbare Charakteristika aufwies, wurde nach der Immortalisierung noch eine Klonierung vorgenommen. Dabei wurde eine Zelle mit epitheloider Morphologie ausgewählt. Zwischen den SV40T-immortalisierten MoKi-Zellen und den korrespondierenden Primärzellen waren keine morphologischen Unterschiede erkennbar.

Insgesamt wurden 14 Zellkulturen (12 Primärzellkulturen und zwei Zelllinien) für die Untersuchung von Virus-Wirts-Interaktionen aus den Organen von *M. condylurus* entwickelt, um ein möglichst breites Spektrum an unterschiedlichen Zelltypen dieser Fledermausspezies berücksichtigen zu können.

4.2.3 Auswahl des Antikörpers für den Nachweis von *M. condylurus* NPC1

Die aus den Transkriptomdaten erhaltene partielle *M. condylurus* NPC1-Sequenz entsprach den Aminosäuren 105-605 des humanen NPC1. Für die Auswahl des humanen Antikörpers für die Erkennung von *M. condylurus* NPC1 wurden Sequenzalignments mit der humanen NPC1-Sequenz unter Verwendung des *ClustalW* Algorithmus vorgenommen, um eine möglichst konservierte Region zu identifizieren (Anhang, Abbildung 11A). Basierend auf diesen Analysen wurde ein monoklonaler Maus anti-Human-NPC1-Antikörper (ab55706, abcam) ausgewählt, der im Bereich der hochkonservierten N-Terminalen Domäne (NTD) bindet (Aminosäuren 151-250). Die *M. condylurus*- und humane NPC1-Sequenz weisen in diesem Bereich eine 91 %ige Übereinstimmung auf (Anhang, Abbildung 11B).

4.2.4 Multiple Alignments von Fledermaus-NPC1-Partialsequenzen

Sequenzalignments von *M. condylurus*-NPC1 mit anderen relevanten Spezies zeigten, dass bei Mensch, *M. condylurus* und anderen möglichen Reservoirspezies wie *Hypsignathus monstrosus* eine Asparaginsäure an Position 502 des NPC1-Proteins lokalisiert ist (Anhang, Abbildung 11C). Die Interaktion von *M. condylurus* NPC1 mit dem Ebola-GP-Protein sollte daher wie beim humanen NPC1-Protein möglich sein.

4.2.5 Charakterisierung der NPC1-Rezeptor-Expression

Eine Schlüsselkomponente für den Eintritt von Filoviren in die Wirtszellen ist das Protein NPC1. Aufgrund der ausschlaggebenden Rolle dieses

Wirtszellfaktors für die Replikation von Filoviren wurde eine Charakterisierung der NPC1-Rezeptor-Expression in den generierten Zellkulturen von *M. condylurus* vorgenommen. Dabei sollte untersucht werden, ob bereits auf der Rezeptorebene Unterschiede zu humanen Zelllinien und Zellkulturen von der europäischen Fledermaus *N. noctula* zu erkennen sind.

4.2.5.1 Konfokale Mikroskopie

Insgesamt wurden Immunfluoreszenz-Signalintensitäten von 23 Primärzellkulturen und immortalisierten Zelllinien von *M. condylurus*, *N. noctula*, *Chlorocebus sp.* und Mensch verglichen (Tabelle 7). Bei den unterschiedlichen Zellkulturen konnten deutliche Unterschiede der NPC1-Rezeptor-Expressionslevel festgestellt werden. Entsprechend der Stärke des Immunfluoreszenzsignals wurden die Zellkulturen in drei Kategorien klassifiziert: Niedriges (hellrot), mittleres (mittelrot) oder hohes NPC1-Rezeptor-Expressionslevel (dunkelrot). Beispiele von konfokalen Mikroskopiebildern für Zellkulturen mit hohen, mittleren und niedrigen NPC1-Rezeptor-Expressionsleveln wurden in Abbildung 11 dargestellt. Alle bis auf eine Zellkultur (MoSp Prim Late) von *M. condylurus* wiesen geringere NPC1-Rezeptor-Expressionslevel als die untersuchten humanen Zellkulturen, die Affenzellkultur und die Zellkulturen von der europäischen Fledermaus *N. noctula* auf. Die höchsten NPC1-Rezeptor-Expressionslevel wiesen HeLa-, HEK293- und NyKi/NyKi Prim-Zellen auf (Abbildung 11A, Abbildung 12). Mittlere Expressionslevel wurden unter anderem bei der MoKi-Zelllinie (Abbildung 11B) detektiert. Die niedrigsten Level an NPC1-Rezeptor wurden in MoTra Prim-Zellen (Abbildung 11C) und MoSp Prim-Zellen detektiert.

Beim Vergleich von *M. condylurus*-Primärzellen mit niedrigen Passagenzahlen mit den entsprechenden Zellen mit höheren Passagenzahlen war darüber hinaus festzustellen, dass das NPC1-Rezeptor-Expressionslevel mit steigender Passagenzahl ebenfalls anstieg.

Tabelle 7: NPC1-Rezeptor-Expressionslevel in unterschiedlichen Fledermauszellkulturen, humanen und Affenzelllinien bestimmt mit konfokaler Mikroskopie und Durchflusszytometrie

Organ	Passage Nr.	Status der Immortalisierung	Name Zellkultur	Zusammensetzung Zellkultur	NPC1-Rezeptor-Expressionslevel	
					Konfokale Mikroskopie	Durchflusszytometrie in [%] im Vergleich zu MoKi-Zellen
Zervix	5	I	HeLa	Homogen	HOCH	n.v.
Niere	29	I	NyKi	Homogen		239,83
Niere	4	P	NyKi Prim	Homogen		213,66
Milz	29	P	MoSp Prim Late	Homogen		207,49
Niere	5	I	HEK293	Homogen		198,37
Niere	47	I	Vero UNC	Homogen		n.v.
Muskel	1	P	MoMu Prim	Homogen		143,81
Gehirn	1	P	MoBra Prim	Heterogen	MITTEL	122,44
Leber	5	P	MoLi Prim	Heterogen		n.v.
Leber	14	I	MoLi	Homogen		109,04
Niere	9	I	MoKi	Homogen		100
Herz	65	P	MoHe Prim Late	Homogen		85,07
Hoden	1	P	MoTes Prim	Heterogen		74,52
Niere	19	P	MoKi Prim Late	Homogen		52,71
Knochenmark	1	P	MoMac Prim	Homogen		n.v.
Herz	5	P	MoHe Prim	Heterogen		n.v.
Lymphknoten	1	P	MoLyN Prim	Heterogen		n.v.
Niere	7	P	MoKi Prim	Heterogen	NIEDRIG	n.v.
Haut	1	P	MoSk Prim	Homogen		79,37
Lunge	7	P	MoLu Prim	Homogen		71,90
Leber	7	P	NyLi Prim	Heterogen		n.v.
Milz	5	P	MoSp Prim	Heterogen		n.v.
Trachea	5	P	MoTra Prim	Homogen		50,55

Status der Immortalisierung: I = SV40T immortalisiert; P = Primärzellen oder spontan immortalisierte Zellen. n.v. = nicht verfügbar

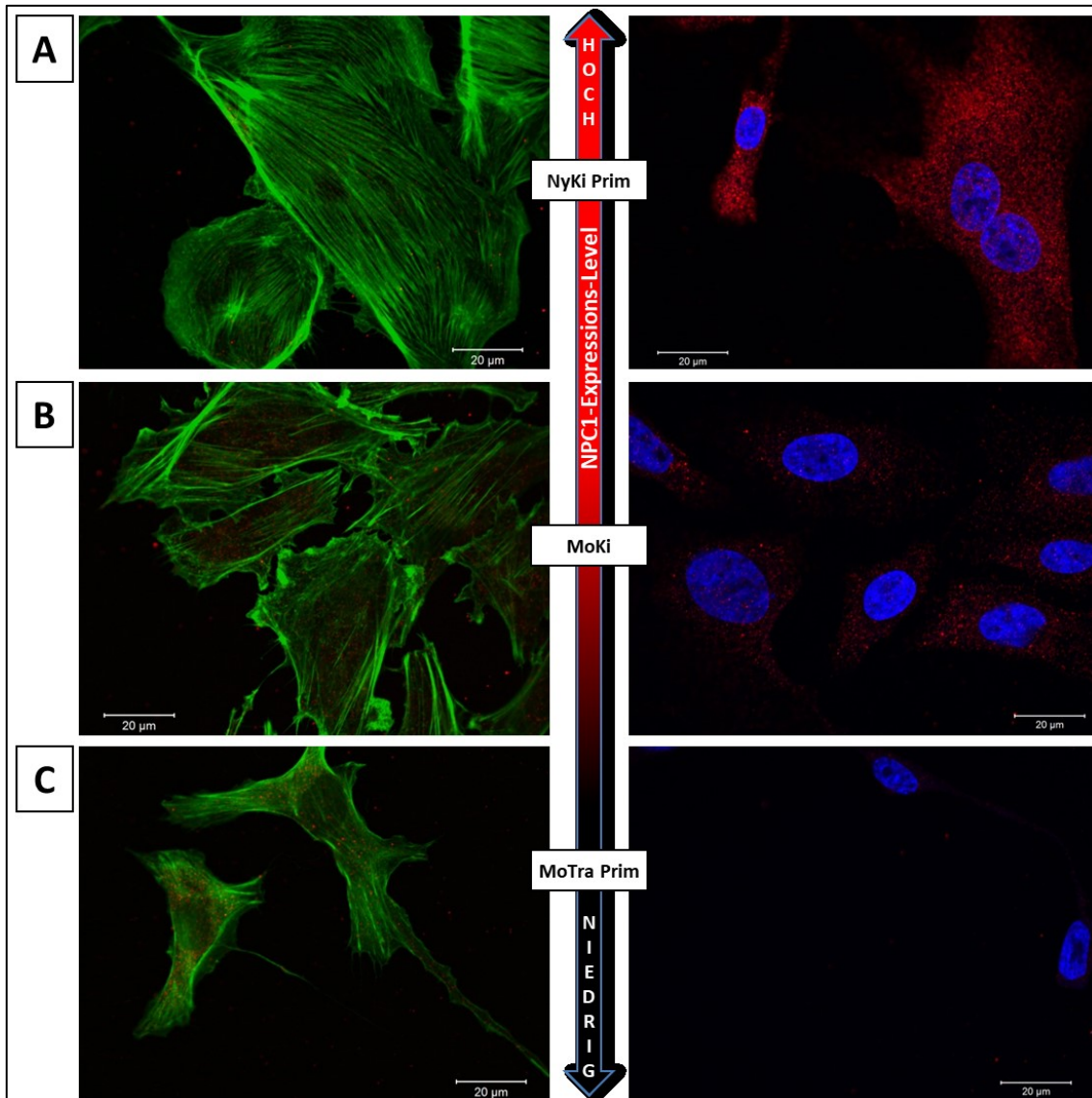


Abbildung 11: Vergleich der NPC1-Rezeptor-Expressionslevel in verschiedenen Fledermaus-Zellkulturen mit konfokaler Mikroskopie

Linke Spalte: Gefärbtes Aktinzytoskelett (grün). Rechte Spalte: Gefärbter NPC1-Rezeptor (rot) und Zellkerne (blau). NPC1-Rezeptor-Expressionslevel: A) NyKi Prim (hoch), B) MoKi (mittel), C) MoTra Prim (niedrig).

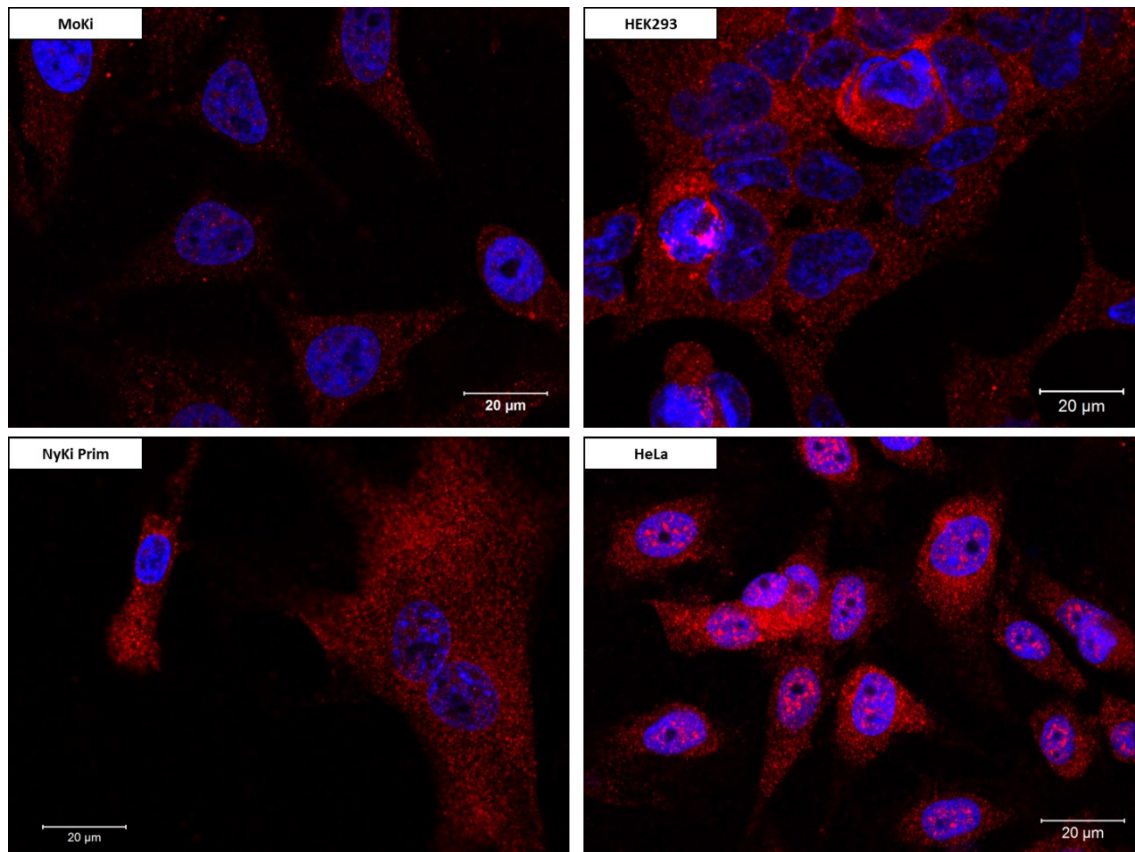


Abbildung 12: Vergleich der NPC1-Rezeptor-Expressionslevel zwischen zwei Fledermaus-Zellkulturen und zwei humanen Zelllinien

Gefärbter NPC1-Rezeptor (rot), Zellkerne (blau). NPC1-Rezeptor-Expressionslevel von MoKi-Zellen (mittel) und von NyKi Prim-, HEK293- und HeLa-Zellen (hoch).

Beobachtet werden konnte dies für MoSp Prim-, MoHe Prim- und MoKi Prim-Zellkulturen, bei denen die Zellkulturen in höheren Passagenzahlen auch höhere NPC1-Rezeptor-Expressionslevel aufwiesen, als die entsprechenden Primärzellkulturen mit niedrigen Passagenzahlen (Tabelle 7). Besonders ausgeprägt war dieses Phänomen für MoSp Prim-Zellen zu beobachten: MoSp Prim-Zellen mit niedriger Passagenzahl wiesen (zusammen mit MoTra Prim-Zellen) die niedrigsten NPC1-Rezeptor-Expressionslevel von allen untersuchten Zellen auf, wohingegen MoSp Prim-Zellen mit hoher Passagenzahl, die höchsten Expressionslevel von allen getesteten *M. condylurus*-Zellen aufwiesen (Anhang, Abbildung 12).

Im Gegensatz zu den Beobachtungen bei Primärzellkulturen in unterschiedlichen Passagenzahlen waren die Ergebnisse der Untersuchung der

NPC1-Rezeptor-Expressionslevel bei SV40T-immortalisierten Fledermaus-Zelllinien in Abhängigkeit vom untersuchten Zellkulturtyp unterschiedlich: So wiesen MoLi Prim-Zellen und immortalisierte MoLi-Zellen ähnliche Level an NPC1-Rezeptor-Expression auf. Bei *M. condylurus*-Nierenzellen war das NPC1-Rezeptor-Expressionslevel in immortalisierten Zellen auf einem ähnlichen Niveau wie bei Nierenzellen mit höheren Passagenzahlen, aber deutlich höher als bei Nierenprimärzellen mit niedrigen Passagenzahlen. Im Gegensatz dazu wiesen die immortalisierten NyKi-Zellen eine geringere NPC1-Rezeptor-Expression als die entsprechenden NyKi Prim-Zellen auf (Tabelle 7).

4.2.5.2 Durchflusszytometrie

Fünf Primärzellkulturen (MoHe Prim, MoKi Prim in niedriger Passagenzahl, MoMac Prim, MoLyN Prim und NyLi Prim) konnten nicht durchflusszytometrisch gemessen werden, da die minimale Zellzahl für die Untersuchung von 5×10^6 Zellen nicht erreicht werden konnte. Die detektierbare intrazelluläre Antikörperfärbung war bei allen Zellen signifikant höher als bei den Isotypkontrollen (Anhang, Abbildung 13).

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie wurden als relative x-fache Änderung (*Fold Change*) berechnet und der unspezifische Hintergrund der Isotypkontrolle wurde vom Mittelwert der Fluoreszenzintensität (*Mean Fluorescence Intensity*, MFI) subtrahiert. Zum Vergleich der NPC1-Rezeptor-Expressionslevel wurde das Expressionslevel der MoKi-Zelllinie als 100 % definiert und die Expressionslevel der anderen Zellen auf die MoKi-Zelllinie bezogen (Tabelle 7; Seite 65). Relativ zur MoKi-Zelllinie wurde das Expressionslevel der Zellkulturen als hoch (> 140 %), mittel (80-140 %) oder niedrig (< 80 %) klassifiziert (Abbildung 13). Abweichungen von mehr als 20 % vom arithmetischen Durchschnitt innerhalb des Triplikats wurden nicht akzeptiert und die entsprechenden Daten nicht berücksichtigt. In Abhängigkeit von der Heterogenität der Zellkulturen erfolgte die Akquisition der Daten in großen *Gates*, um eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen bei der Messung zu erfassen. Während beispielsweise MoTra Prim-Zellkulturen sehr homogen

zusammengesetzt waren (kleine *Gates*), konnte in MoLi Prim-Zellkulturen eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen detektiert werden (große *Gates*) (Anhang, Abbildung 14).

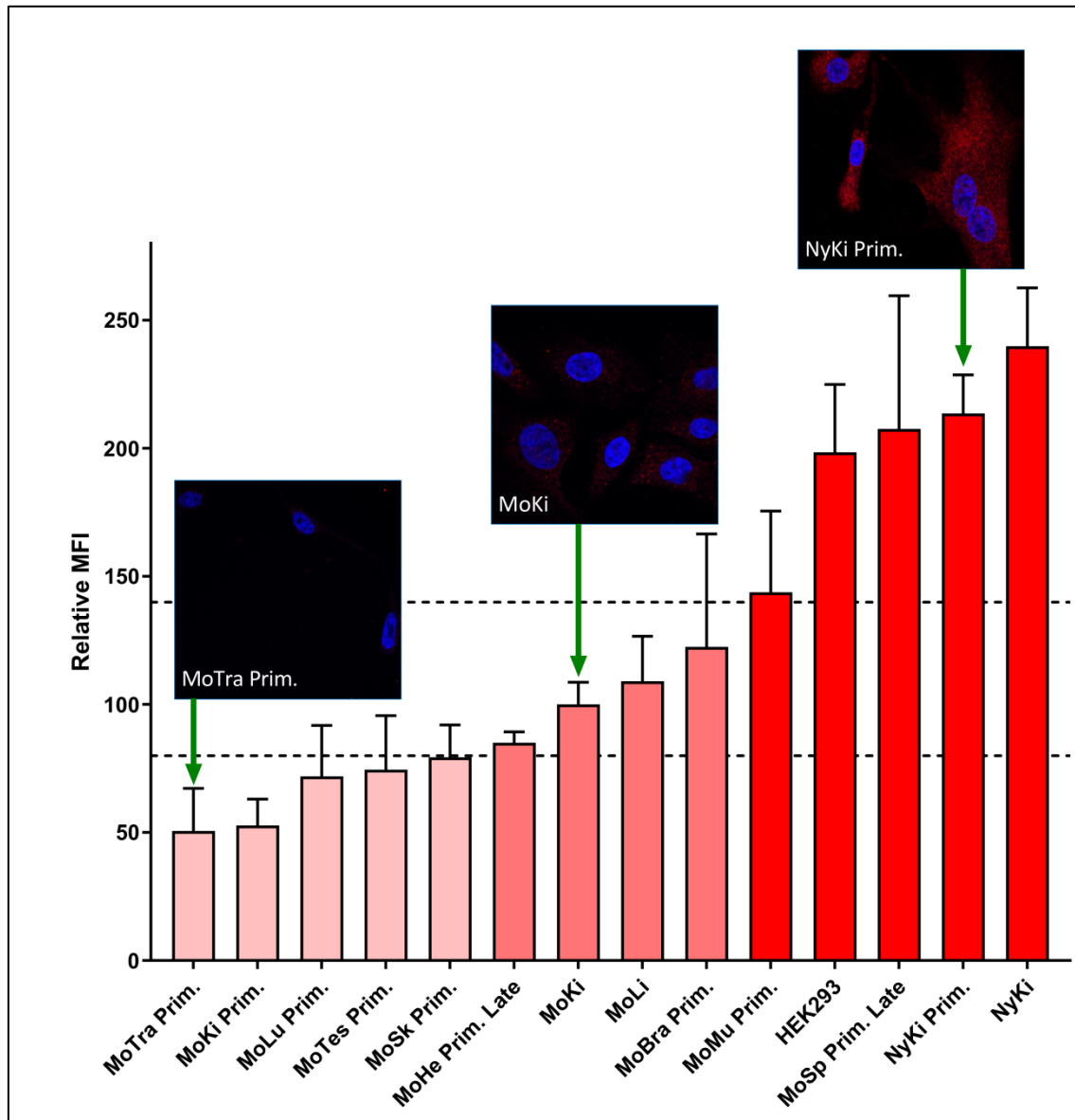


Abbildung 13: Prozentsatz an NPC1-Rezeptor-Expression im Vergleich zur MoKi-Zelllinie bestimmt durch Durchflusszytometrie

NPC1-Rezeptor-Expressionslevel: Niedriges Expressionslevel (hellrot: unter 80 %), mittleres Expressionslevel (mittelrot: 80-140 %), hohes Expressionslevel (dunkelrot: über 140 %). Die konfokalen Bilder zeigen exemplarisch drei unterschiedliche NPC1-Rezeptor-Expressionslevel: MoTra Prim (niedrig), MoKi (mittel) und NyKi Prim (hoch); grüne Pfeile zeigen die korrespondierenden Balken für die durchflusszytometrische Messung.

Innerhalb des Triplikats kam es bei der durchflusszytometrischen Messung von MoLi-Prim-Zellkulturen zu erheblichen Schwankungen der Fluoreszenzintensitäten, so dass diese Messungen bei der Analyse der Daten ausgeschlossen wurden. Stattdessen wurde durch SV40T-Immortalisierung und kontinuierliches Passagieren eine relativ homogene Leberzellkultur erzeugt, deren NPC1-Rezeptor-Expressionslevel gemessen werden konnte (Anhang, Abbildung 15).

Bei der durchflusszytometrischen Messung der NPC1-Rezeptor-Expressionslevel von 14 verschiedenen Zellkulturen konnten deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelltypen festgestellt werden (Tabelle 7). Zehn von 11 getesteten *M. condylurus*-Zellkulturen wiesen geringere NPC1-Rezeptor-Expressionslevel als die humanen HEK293-Zellen und die *N. noctula*-Zellen (NyKi Prim und NyKi) auf. Die niedrigsten Level an NPC1-Rezeptor wurden dabei bei MoTra Prim-Zellen detektiert. Mittlere Expressionslevel konnten beispielsweise bei MoKi-Zellen, die höchsten Expressionslevel bei HEK293-, NyKi Prim- und NyKi-Zellen detektiert werden. Auffallend hoch war das NPC1-Rezeptor-Expressionslevel in MoSp Prim Late-Zellen.

Die Zuordnung der Zellkulturen zu Kategorien mit hohem, mittlerem und niedrigem Expressionslevel basierend auf den durchflusszytometrischen Messungen korrespondierte weitestgehend mit der Einteilung, die bei der Auswertung der konfokalen Mikroskopie der Zellen vorgenommen wurde. Ausnahmen bildeten MoTes Prim- und MoKi Prim Late-Zellkulturen, deren mittels konfokaler Mikroskopie bestimmtes NPC1-Rezeptor-Expressionslevel höher als das durch Durchflusszytometrie detektierte Level war.

4.3 Infektion von Fledermauszellkulturen mit Filoviren

Im Hochsicherheitslabor des Robert Koch-Instituts wurden die etablierten *M. condylurus*-Zellkulturen mit EBOV infiziert und nach 1, 24, 72 und 96 h die Kopienzahl viraler RNAs pro ml Zellkulturüberstand bestimmt. Die Virusreplikationskinetik von insgesamt 15 verschiedenen Zellkulturen wurde

anschließend miteinander verglichen. Es sollte untersucht werden, ob das NPC1-Rezeptor-Expressionslevel in Zellen einen Einfluss auf die EBOV-Replikationskinetik hat. Daher wurden acht verschiedene Primärzellkulturen von *M. condylurus* ausgewählt, die unterschiedliche NPC1-Rezeptor-Expressionslevel aufwiesen (Tabelle 7): MoTra Prim, MoLu Prim, MoSp Prim Early, MoKi Prim und MoSk Prim (niedrige Expressionslevel); MoLi Prim, MoTes Prim und MoBra Prim (mittlere Expressionslevel). Darüber hinaus wurden die SV40T-immortalisierten MoKi-Zellen (mittleres Expressionslevel) inkludiert. Als Vergleichszellen fungierten NyKi Prim-, Vero UNC, HeLa- und HEK293-Zellen (hohes Expressionslevel) und HEK293 Δ NPC1-Zellen (keine NPC1-Rezeptorexpression). Außerdem wurden spontan immortalisierte MoSp Prim Late-Zellen (hohes Expressionslevel) inkludiert, um die Replikationskinetik mit MoSp Prim Early-Zellen (niedriges Expressionslevel) zu vergleichen.

4.3.1 EBOV-Replikationskinetik in Zellkulturen

Die Virusreplikation von EBOV erfolgte in den verschiedenen Zellkulturen in unterschiedlichem Ausmaß (Abbildung 14). Um die Virusreplikationsrate zwischen den verschiedenen Zelltypen besser vergleichen zu können, wurde die x-fache Vermehrung der ebolaviralen RNA bei der Replikation ermittelt (Tabelle 8). Da sich innerhalb der ersten 24 h noch Teile des Inokulums von den Zellen ablöste und in den Überstand abgegeben wurde, wurde ausschließlich die Virusvermehrung zwischen den Zeitpunkten 24 h und 96 h nach Inokulation berücksichtigt. Eine Probennahme zum Zeitpunkt 48 h nach Inokulation war aus labortechnischen Gründen nicht möglich. Für jede Zellkultur wurde der arithmetische Mittelwert des Triplikats von der RNA-Kopienzahl/ml zum jeweiligen Zeitpunkt berechnet und anschließend der Vermehrungsfaktor ermittelt. Anhand des Vermehrungsfaktors erfolgte die Klassifizierung der Virusreplikationsrate als niedrig (10 x – 29 x Vermehrung), mittel (30 x – 499 x Vermehrung) oder hoch (> 500 x Vermehrung). Bei Vermehrungsfaktoren < 10 x findet keine oder nur in geringem Ausmaß eine Virusreplikation statt.

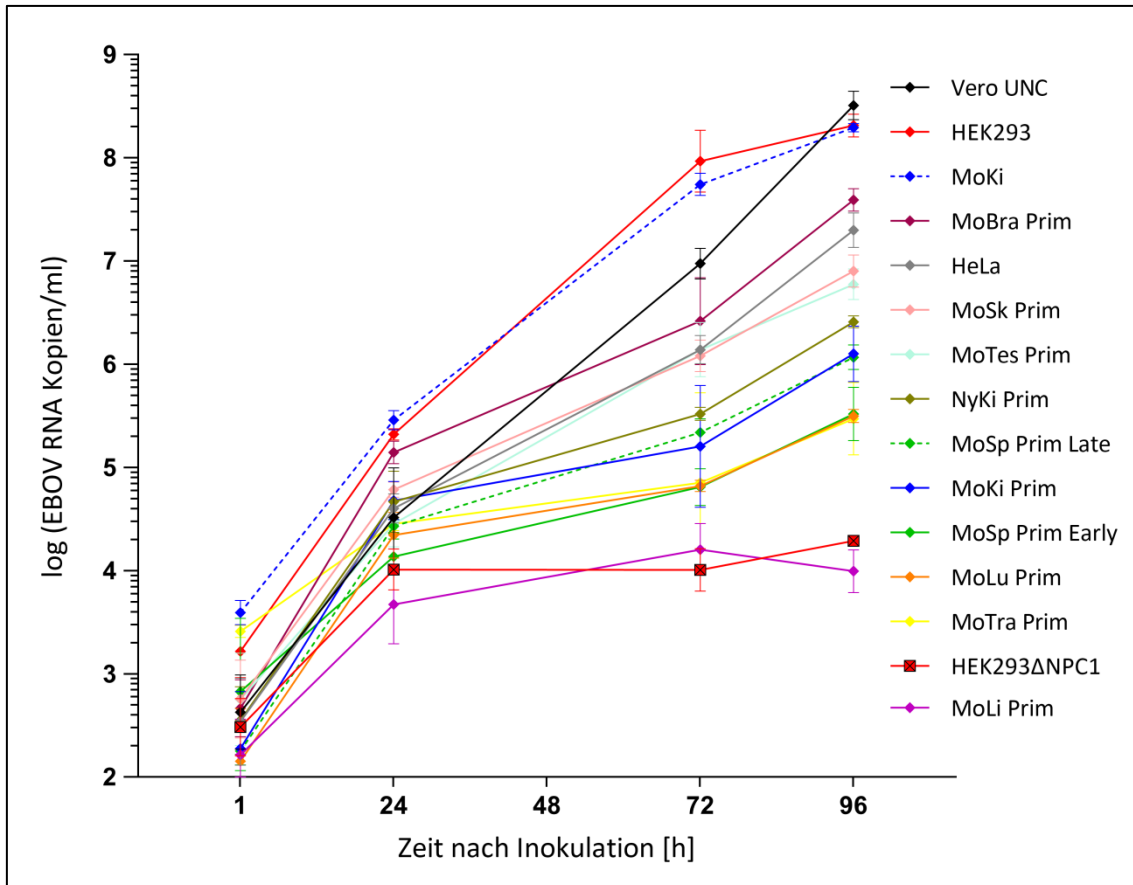


Abbildung 14: EBOV-Replikationskinetik in verschiedenen Zellkulturen

Kopienzahl viraler RNAs pro ml in Zellkulturüberständen. EBOV-Replikation (von unten nach oben): Keine / sehr geringe Virusreplikation (MoLi Prim, HEK293ΔNPC1), niedrige Virusreplikationsrate (MoTra Prim, MoLu Prim, MoSp Prim Early, MoKi Prim), mittlere Virusreplikationsrate (MoSp Prim Late, NyKi Prim, MoTes Prim, MoSk Prim, MoBra Prim) und hohe Virusreplikationsrate (HeLa, MoKi, HEK293, Vero UNC).

Für HEK293ΔNPC1- und MoLi-Prim-Zellen war keine Virusvermehrung innerhalb der ersten 96 h detektierbar. Niedrige Virusreplikationsraten und eine 12 x – 29 x Vermehrung der RNA konnte in vier *M. condylurus*-Primärzellkulturen (MoTra Prim, MoLu Prim, MoSp Prim Early und MoKi Prim) beobachtet werden. In vier weiteren *M. condylurus*-Zellkulturen und einer *N. noctula*-Zellkultur (MoSp Prim Late, MoTes Prim, MoSk Prim, MoBra Prim und NyKi Prim) konnten mittlere Virusreplikationsraten festgestellt werden. In den humanen und Affen-Vergleichszelllinien (HeLa, HEK293 und Vero UNC) und in der SV40T-immortalisierten MoKi-Zelllinie konnten die höchsten

Virusreplikationsraten mit Vermehrungsfaktoren von teilweise mehr als 6500 x detektiert werden.

Tabelle 8: x-fache Vermehrung der ebolaviralen RNA bei der Replikation in unterschiedlichen Zellkulturen

Zellkultur	x-fache Vermehrung der ebolaviralen RNA	Replikationsrate	
Vero UNC	6578	hoch	> 500 x
HEK293	1001		
MoKi	674		
HeLa	504		
MoBra Prim	280	mittel	30 x - 499 x
MoSk Prim	136		
MoTes Prim	199		
NyKi Prim	49		
MoSp Prim Late	44		
MoKi Prim	29	niedrig	10 x - 29 x
MoSp Prim Early	25		
MoLu Prim	13		
MoTra Prim	12		
HEK293ΔNPC1	2	keine / sehr geringe Replikation	< 10 x
MoLi Prim	2		

Für die Berechnung der x-fachen Vermehrung der ebolaviralen RNA wurden die Zeitpunkte 24 h und 96 h nach Infektion herangezogen. Die Replikationsrate wurde als niedrig (10 x – 29 x Vermehrung), mittel (30 x - 499 x Vermehrung) oder hoch (> 500 x Vermehrung) definiert.

Zellkulturüberstände von Vero UNC-, MoKi-, MoBra Prim-, MoTra Prim- und MoLu Prim-Zellen wurden 96 h nach Infektion titriert, um den Anteil an infektiösen Viruspartikeln beurteilen zu können (Abbildung 15). Dieser korrelierte in den meisten Fällen mit den PCR-Ergebnissen: So besaßen die Überstände von Vero UNC- und MoKi-Zellen die höchsten, demgegenüber MoTra Prim- und MoLu Prim-Zellen die niedrigsten Virustiter. Trotz hohen RNA-Titers zeigten MoBra Prim-Zellen nur einen geringen Virustiter auf dem Niveau von MoTra Prim-Zellen.

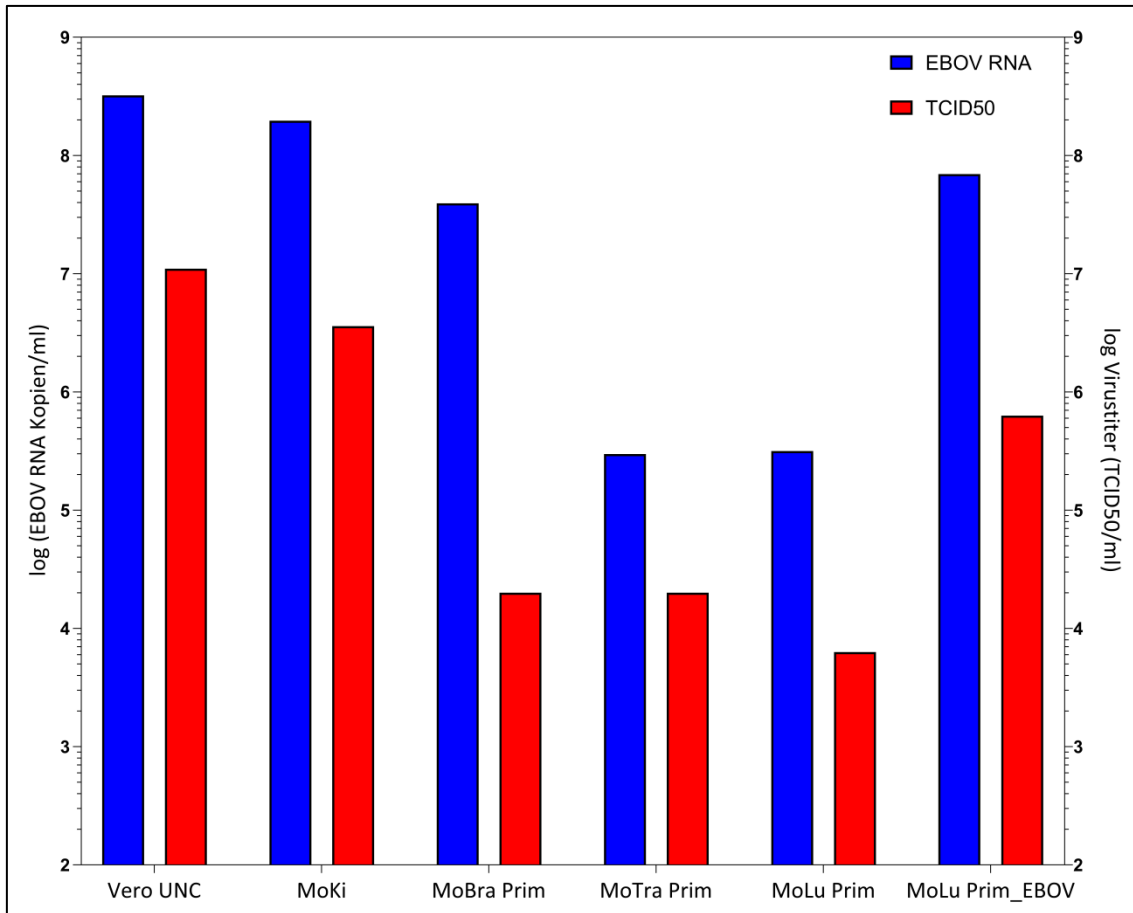


Abbildung 15: Vergleich von EBOV RNA und Virustiter in ausgewählten Zellkulturüberständen

Kopienzahl viraler RNAs pro ml in Zellkulturüberständen (blau, linke Y-Achse). Virustiter als TCID50 pro ml in Zellkulturüberständen (rot, rechte Y-Achse). Überstand von Vero UNC, MoKi, MoBra Prim, MoTra Prim und MoLu Prim 96 h nach Infektion. Überstand von MoLu Prim_EBOV 150 Tage nach initialer Infektion.

4.3.2 Cytopathischer Effekt bei EBOV-infizierten Zellkulturen

Die EBOV-infizierten Zellkulturen wurden mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops über 16 Tage nach Infektion auf die Entwicklung eines cytopathischen Effektes (CPE) untersucht. Alle acht Primärzellkulturen von *M. condylurus* zeigten keinen (MoTra Prim und MoKi Prim) oder geringen CPE. Abbildung 16 zeigt exemplarisch den CPE in Vero UNC-Zellen und in vier Primärzellkulturen von *M. condylurus* an Tag 16 nach Infektion. Bei Vero UNC-Zellen war eine Zunahme der Zellgröße zu beobachten (Abbildung 16B).

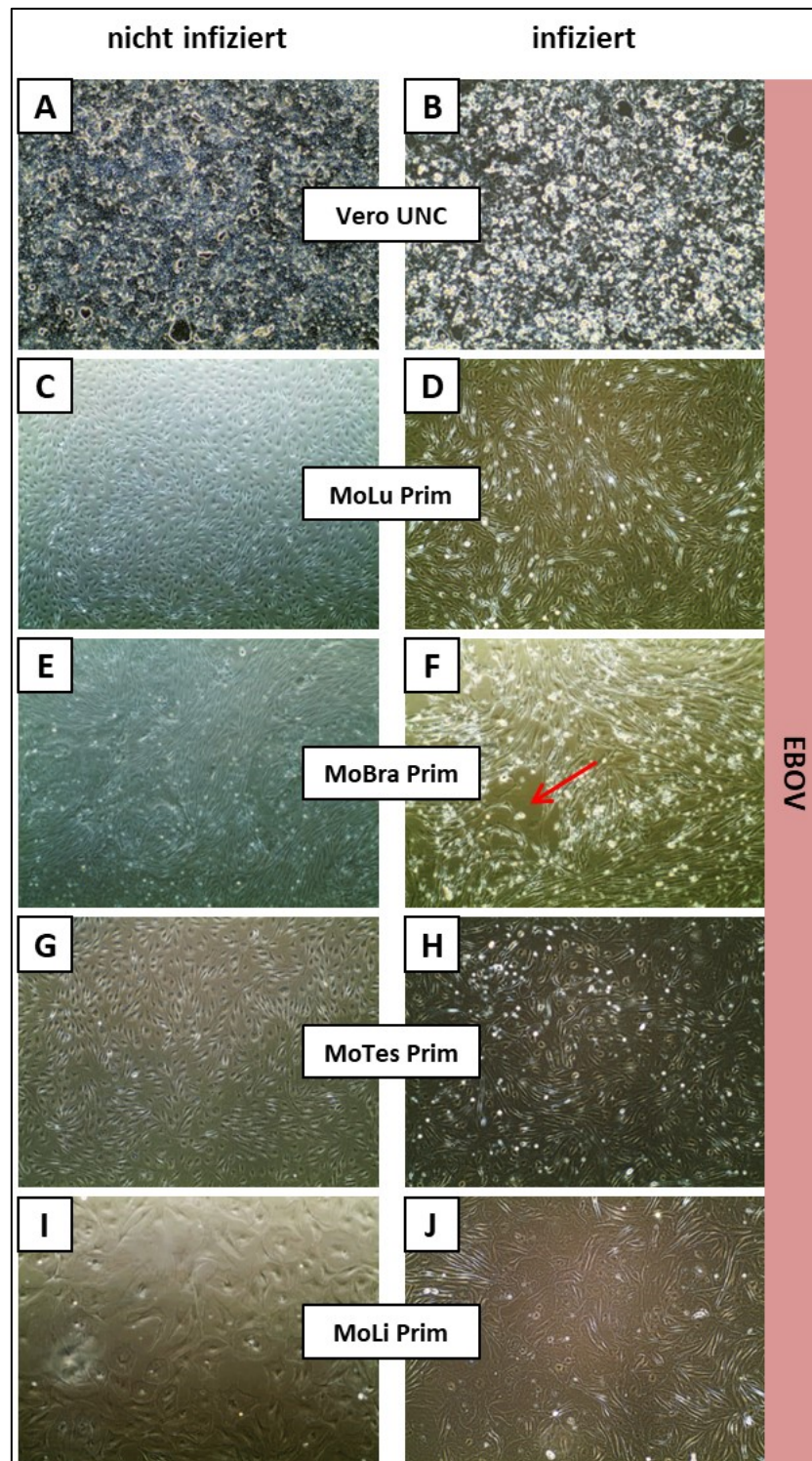


Abbildung 16: Cytopathischer Effekt bei EBOV-infizierten Zellkulturen

Linke Spalte: nicht infizierte Zellen (A, C, E, G, I); Rechte Spalte: EBOV-infizierte Zellen. Cytopathischer Effekt 16 Tage nach Infektion mit Zellvergrößerungen bei Vero UNC (B), erhöhtem Zellwachstum bei MoLu Prim (D), MoTes Prim (H), MoLi Prim (J) oder Plaques bei MoBra Prim (F, roter Pfeil). Phasenkontrastmikroskopie: alle Aufnahmen 10 x.

Im Gegensatz dazu zeigten MoLu Prim-, MoTes Prim-, MoLi Prim- (Abbildung 16D,H,J), MoSp Prim Early- und MoSk Prim-Zellen im Vergleich zu den nicht-infizierten Zellen ein verstärktes Zellwachstum.

Bei MoBra Prim- (Abbildung 16F), MoSp Prim Late- und NyKi Prim-Zellen waren demgegenüber Plaques im Zellrasen zu erkennen, wobei 16 Tage nach Infektion noch 40-80 % des Zellrasens erhalten war.

Die unterschiedlichen humanen Vergleichszellen waren zu diesem Zeitpunkt bereits vollständig von der Zellkulturoberfläche abgelöst: HEK293ΔNPC1-Zellen verloren unabhängig von der Infektion nach vier Tagen die Adhärenz. HEK293- verloren sieben Tage und HeLa-Zellen zehn Tage nach Infektion die Adhärenz.

4.3.3 Einfluss der Filovirusinfektion auf das NPC1-Rezeptor-Expressionslevel

EBOV-infizierte MoLu Prim-, MoBra Prim- und MoKi-Zellen wurden 22 Tage nach Infektion wie in Abschnitt 3.3.7 und 4.2.5.1 beschrieben mittels konfokaler Mikroskopie auf Veränderungen der NPC1-Rezeptor-Expression im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollzellen untersucht (Abbildung 17). Eine Doppelfärbung von NPC1-Rezeptor und ebolaviralen Proteine war aufgrund der hohen Rezeptorexpression nicht darstellbar. Um zu untersuchen, ob die Veränderungen der NPC1-Expression spezifisch bei EBOV-Infektionen auftreten, oder auch bei anderen Filoviren, die denselben Rezeptor verwenden, zu beobachten sind, wurden MoKi-Zellen parallel mit MARV infiziert und mikroskopiert.

Deutlich zu erkennen war, dass die Filovirusinfektion in allen untersuchten Zelltypen zu einer starken Erhöhung des NPC1-Rezeptor-Expressionslevels führte (Abbildung 17B,D,F,H). Bei der Erhöhung der NPC1-Rezeptor-Expression war kein Unterschied zwischen Zellen erkennbar, die eine niedrige Grundexpression (MoLu Prim) oder eine mittlere Grundexpression (MoBra Prim und MoKi) aufwiesen. Auffallend war jedoch, dass zumindest bei MoKi-Zellen die MARV-Infektion zu einer stärkeren Erhöhung des NPC1-Rezeptor-Expressionslevels als die EBOV-Infektion führte (Abbildung 17H).

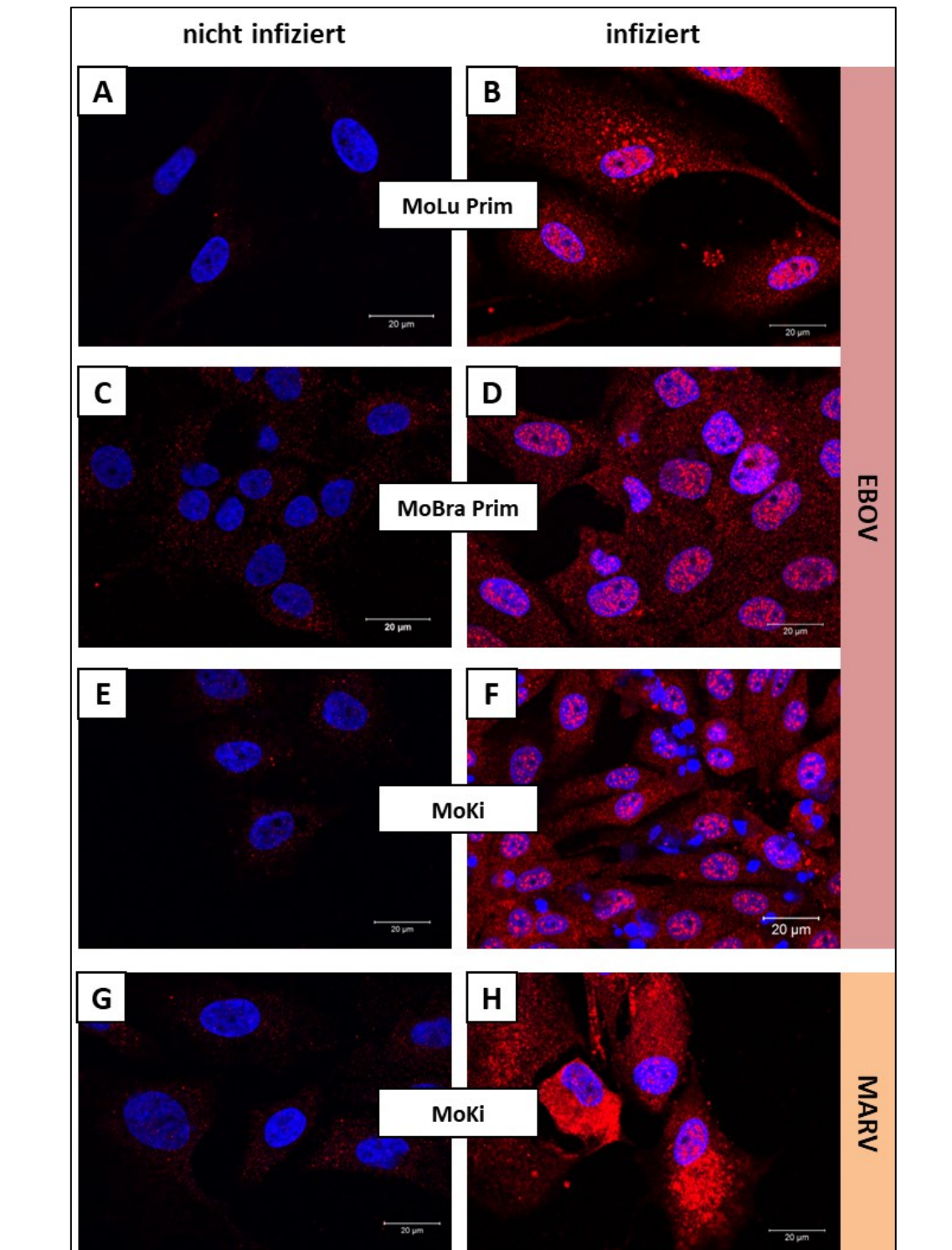


Abbildung 17: NPC1-Rezeptor-Expressionslevel in *M. condylurus*-Zellen nach Infektion mit EBOV und MARV

Gefärbter NPC1-Rezeptor (rot), Zellkerne (blau). Linke Spalte: nicht infizierte Zellen (A: MoLu Prim, C: MoBra Prim, E und G: MoKi); Rechte Spalte: EBOV-infizierte Zellen (B: MoLu Prim, D: MoBra Prim, F: MoKi) und MARV-infizierte Zellen (H: MoKi) mit erhöhter NPC1-Rezeptor-Expression 22 Tage nach Infektion.

4.4 Persistierende EBOV-Infektionen in Zellkulturen

Essentielles Kriterium für die Identifizierung eines natürlichen Reservoirs ist der Nachweis der Persistenz der Infektion in der Reservoirspezies. Einen ersten Hinweis auf die intrinsische Fähigkeit zur Persistenz könnte der Nachweis von persistenten Infektionen in Zellkultur liefern.

Daher wurden einige der EBOV-infizierten Primärzellen aus Abschnitt 4.3 16 Tage nach Infektion von 6-well-Platten in Zellkulturflaschen passagiert. Um zu untersuchen, ob sich eine persistierende EBOV-Infektion in *M. condylurus*-Primärzellen etablieren kann, wurden MoLu Prim, MoBra Prim und MoTes Prim-Zellen ausgewählt. Lungenprimärzellen wurden ausgewählt, da BOMV-RNA in Lungen von *M. condylurus*-Fledermäusen detektiert werden konnte. Gehirn- und Hodenprimärzellen wurden ausgewählt, da Gehirn und Hoden zu den sog. immunprivilegierten Organen zählen, in denen Viren theoretisch leichter eine persistierende Infektion etablieren können.

4.4.1 Langzeitkultivierung und EBOV-Replikationskinetik

EBOV-infizierte MoLu Prim-Zellen zeigten nach der Passage in Zellkulturflaschen ein Zellwachstum auf dem Niveau von nicht-infizierten MoLu Prim-Zellen. Die Zellen wurden einmal wöchentlich bis 150 Tage nach Infektion passagiert und erreichten dabei stets 100 %ige Konfluenz (Abbildung 18A, unten). Die Zellviabilität lag stets zwischen 95-100 %. Die langzeitinfizierten MoLu-Prim-Zellen konnten in Einfriermedium bei -80°C eingefroren und erfolgreich wieder aufgetaut werden.

EBOV-infizierte MoBra Prim- und MoTes Prim-Zellen wurden bis 74 Tage nach Infektion kultiviert. Dabei wurde wöchentlich nur das Zellkulturmedium gewechselt, da das Zellwachstum soweit verlangsamt war, dass die Zellen keine Konfluenz erreichten (Abbildung 18B und C). Es erfolgten im gesamten Zeitraum nur zwei Passagen. Die Viabilität der Zellen lag für beide Zelltypen bei 80-85 %. MoBra Prim-Zellen erreichten dabei in bestimmten Bereichen der Zellkulturoberfläche bis zu 50 % Konfluenz, was MoTes Prim-Zellen nicht erreichten. An Tag 67 nach Infektion war zu erkennen, dass sich MoBra Prim-

und MoTes Prim-Zellen von der Zellkulturoberfläche abzulösen begannen. Bis zum Tag 74 nach Infektion waren alle Zellen abgelöst und abgestorben.

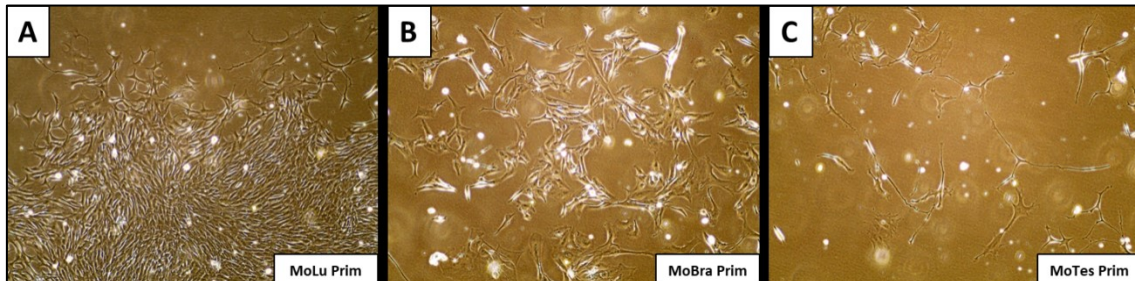


Abbildung 18: Langzeitkultivierung von EBOV-infizierten Primärzellen von *M. condylurus*

Primärzellen von Lungen (A), Gehirn (B) und Hoden (C) von *M. condylurus* 37 Tage nach Infektion mit EBOV. A: MoLu Prim mit schnellem Zellwachstum und Bereichen mit 100 %iger Konfluenz; B: MoBra Prim mit langsamen Zellwachstum und geringerer Zelldichte; C: MoTes Prim mit kaum erkennbarem Zellwachstum und insgesamt geringer Zellzahl. Phasenkontrastmikroskopie: alle Aufnahmen 10 x.

Die Menge ebolaviraler RNA pro ml Zellkulturüberstand wurde in wöchentlich abgenommenen Zellkulturüberständen mittels RT-qPCR untersucht (Abbildung 19). 32 Tage nach Infektion mit EBOV wiesen alle drei Zellkulturen sehr ähnliche Mengen viraler RNA im Überstand von $2,5\text{--}3 \times 10^7$ Kopien/ml auf. Bei MoLu-Prim-Zellen waren kontinuierlich bis 150 Tage nach Infektion große Mengen viraler RNA von teilweise über 3×10^8 Kopien/ml nachweisbar. Bei MoBra Prim-Zellen und MoTes Prim-Zellen waren am letzten Beprobungstag 74 Tage nach Infektion noch ca. 2×10^6 Kopien/ml bzw. 2×10^5 Kopien/ml nachweisbar.

Nur bei den MoLu Prim-Zellen kam es zu einer persistenten EBOV-Infektion, bei der die Zellen dauerhaft mit dem Virus überlebten und kontinuierlich große Mengen ebolaviraler RNA in den Überstand abgaben. Die persistent mit EBOV infizierten MoLu Prim-Zellen wurden fortan als MoLu Prim_EBOV bezeichnet.

Die Titration der Zellkulturüberstände von MoLu Prim-Zellen 96 h nach Infektion und von MoLu Prim_EBOV-Zellen 150 Tage nach Infektion ergab einen Anstieg von 6×10^3 auf 6×10^5 TCID₅₀/ml bei einem korrespondierenden RNA-Titer von 3×10^5 auf 7×10^7 EBOV RNA Kopien/ml (Abbildung 15).

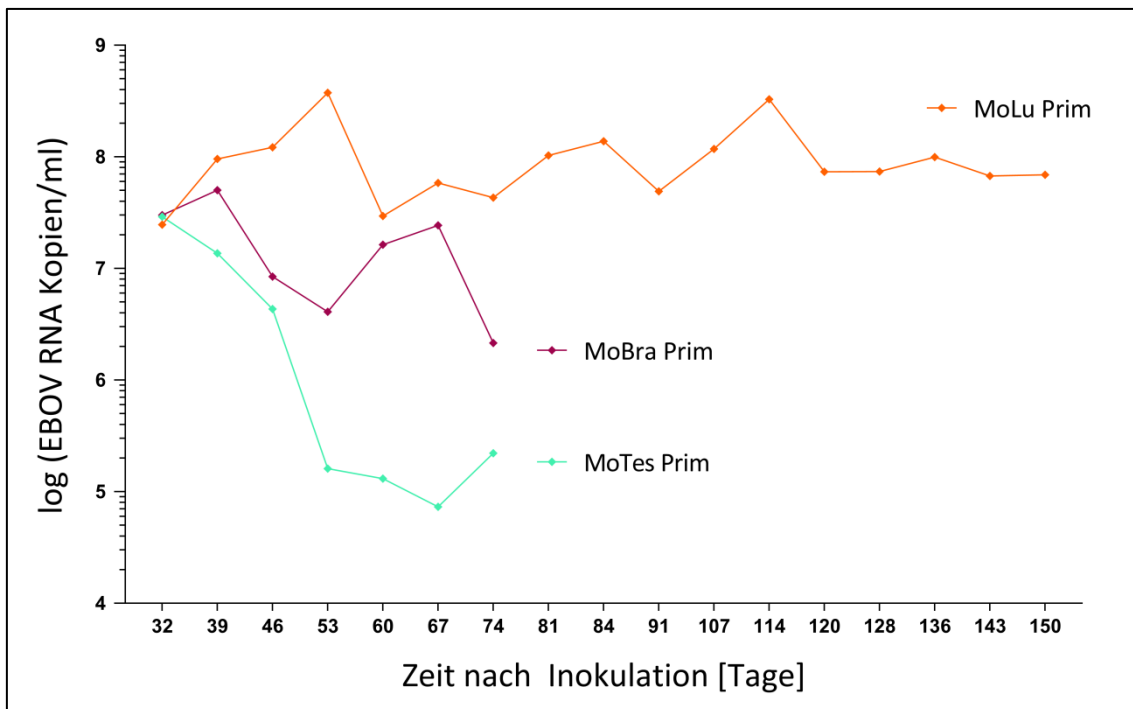


Abbildung 19: EBOV-Replikationskinetik in langzeitinfizierten *M. condylurus*-Zellen

Kopienzahl viraler RNAs pro ml in Zellkulturüberständen von MoLu Prim- (orange), MoBra-Prim- (violett) und MoTes Prim-Zellen (türkis).

4.4.2 EBOV-GFP-Infektion von ausgewählten Primärzellkulturen

Um den Anteil der infizierten Zellen im Monolayer bei unterschiedlichen Zellkulturen zu visualisieren, wurden ausgewählte *M. condylurus*-Primärzellkulturen mit EBOV-GFP infiziert. MoLu Prim- und MoBra Prim-Zellen wurden ausgewählt, da diese Zellen über einen langen Zeitraum nach Infektion mit EBOV kultiviert werden konnten (siehe Abschnitt 4.4.1). MoLi Prim- und MoKi-Zellen wurden ausgewählt, da in ihnen innerhalb der ersten 96 h keine Virusreplikation detektiert werden konnte bzw. die höchsten Virusreplikationsraten aller *M. condylurus*-Zellen festgestellt werden konnten (siehe Abschnitt 4.3.1). HEK293ΔNPC1-Zellen fungierten als Kontrolle.

Der Anteil der infizierten Zellen und die Ausbreitung der Infektion im Monolayer unterschieden sich deutlich je nach Zellkulturtyp (Abbildung 20). HEK293ΔNPC1-Zellen zeigten bis Tag 4 nach Infektion keine Anzeichen einer Infektion. Nach vier Tagen lösten sich die Zellen aufgrund des NPC1-Knockouts vollständig von der Zellkulturoberfläche ab. Bei MoKi-Zellen war an Tag 1 nach

Infektion der Anteil der infizierten Zellen im Monolayer am größten. An Tag 8 war bereits ein hoher Anteil von Zellen erkennbar, der sich von der Zellkulturoberfläche ablöste und an Tag 11 waren alle MoKi-Zellen vollständig abgelöst.

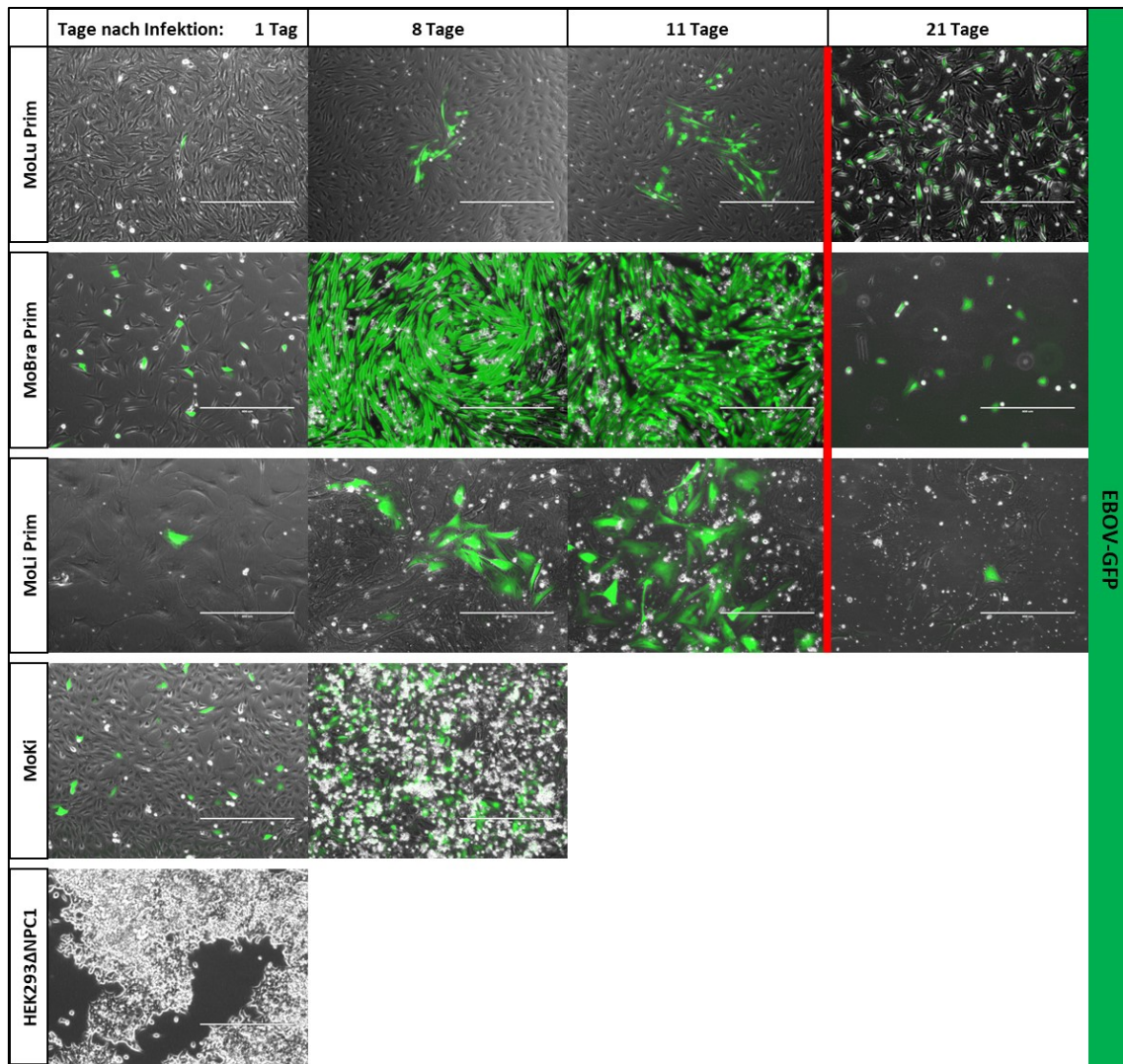


Abbildung 20: EBOV-GFP-Infektion von Zellkulturen

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung verschiedener Zellkulturen bis 21 Tage nach Infektion mit EBOV-GFP. Infizierte Zellen bilden GFP (grün). Mikroskopie (wenn möglich) an Tag 1, 8, 11 und 21 nach Infektion. Erste Passage der infizierten Zellen an Tag 19 (roter Balken). Maßstabsbalken entspricht 400 µm.

Obwohl in MoLi-Prim-Zellen keine Virusvermehrung innerhalb der ersten 96 h im Zellkulturüberstand detektierbar war (Abschnitt 4.3.1), waren MoLi Prim-Zellen nicht refraktär und wurden infiziert. Allerdings waren an Tag 1

nach Infektion im gesamten Monolayer lediglich sieben infizierte Zellen im Well der 6-well-Platte erkennbar. Auch für MoLu Prim-Zellen konnten lediglich acht infizierte Zellen an Tag 1 nach Infektion identifiziert werden. Wie in Abbildung 20 erkennbar, breitete sich die Infektion bei MoLi Prim- und MoLu Prim-Zellen sehr langsam im Monolayer aus. Aus den infizierten Einzelzellen entwickelten sich bis Tag 11 Cluster an infizierten Zellen, die von vielen nicht-infizierten Zellen umgeben waren. Bei MoBra Prim waren bereits an Tag 1 nach Infektion zahlreiche infizierte Zellen erkennbar (etwas weniger als bei der MoKi-Zelllinie). An Tag 8 waren 100 % der Zellen infiziert. MoLu Prim-, MoBra Prim- und MoLi Prim-Zellen wurden an Tag 19 nach initialer Infektion in Zellkulturflaschen passagiert (Abbildung 20, roter Balken). Während die MoLu Prim-Zellen an Tag 21 bereits eine relativ hohe Zelldichte zeigten und der Anteil der infizierten Zellen zunahm, zeigten MoBra Prim- und MoLi Prim-Zellen kaum Zellwachstum. Zwar waren immer noch 100 % der MoBra Prim-Zellen infiziert, aber die Zellen bildeten keinen Monolayer mehr aus.

Die Kultivierung der EBOV-GFP-infizierten Lungenzellen wurde bis Tag 62 nach initialer Infektion fortgesetzt (Anhang, Abbildung 16). Dabei wurden die Zellen einmal wöchentlich passagiert und erreichten dabei stets 100 %ige Konfluenz. Analog zu Abschnitt 4.4.1 wurde die Zellviabilität bei allen Passagen auf 95-100 % bestimmt und die langzeitinfizierten MoLu Prim-Zellen in Einfriermedium bei -80°C eingefroren und erfolgreich wieder aufgetaut. Nach dem Auftauen der Zellen und Ausbildung des Monolayers war der Anteil der infizierten Zellen vergleichbar mit dem Anteil infizierter Zellen in den kontinuierlich passagierten MoLu Prim-Zellen.

Wie schon zuvor mit EBOV entwickelte sich auch mit EBOV-GFP eine persistierende Infektion in Lungenprimärzellen von *M. condylurus*. Die persistent mit EBOV-GFP infizierten MoLu Prim-Zellen wurden fortan als MoLu Prim_EBOV-GFP bezeichnet.

4.4.3 Konfokale Mikroskopie von persistent infizierten Lungenzellen

Um bei MoLu Prim_EBOV-Zellen den Anteil der infizierten Zellen an der Gesamtzellpopulation nach Langzeitkultivierung zu untersuchen, wurden die

Zellen 143 Tage nach initialer Infektion wie in Abschnitt 3.3.7 beschrieben mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. Nach 143 Tagen war nur ein gewisser Anteil der Zellen infiziert (Abbildung 21A). Es war zu erkennen, dass EBOV-infizierte Zellen (grün) von vielen nicht-infizierten Zellen (rote Ellipse) umgeben waren (Abbildung 21B-D). Der Anteil der EBOV-infizierten Zellen an der gesamten Zellpopulation nach 143 Tagen schien vergleichbar mit dem Anteil der EBOV-GFP-infizierten MoLu Prim-Zellen an Tag 11 (Abbildung 20) oder an Tag 62 nach initialer Infektion (Anhang, Abbildung 16).

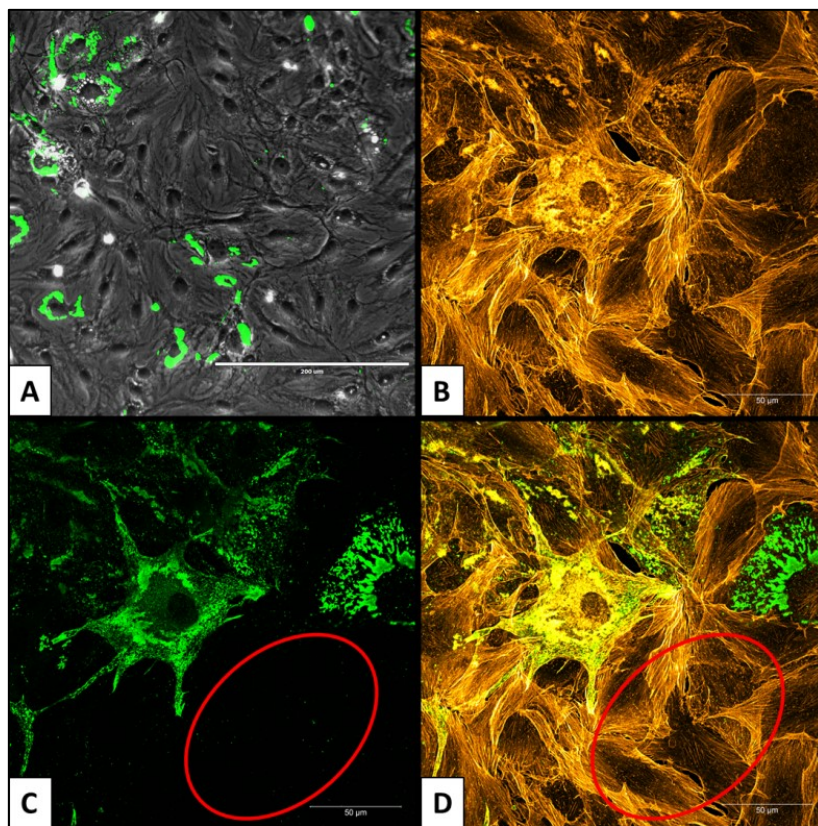


Abbildung 21: Persistierend infizierte MoLu Prim_EBOV-Zellen 143 Tage nach initialer Infektion

Gefärbtes EBOV-NP-Protein (grün). Gefärbtes Aktinzytoskelett (orange). A: Übersichtsaufnahme - Fluoreszenzmikroskopie: Maßstabsbalken entspricht 200 µm. B: Gefärbtes Aktinzytoskelett; C: Nachweis von EBOV-NP im selben mikroskopischen Ausschnitt. D: Überlagerung von B und C; Bereiche mit nicht-infizierten Zellen (rote Ellipse). Konfokale Mikroskopie (B-D): Maßstabsbalken entspricht 50 µm.

4.5 Einfluss von Temperatur auf Zellkulturen und Filovirusreplikation

4.5.1 Ermittlung relevanter Umgebungstemperaturen von *M. condylurus* an der Elfenbeinküste

Um zu ermitteln, welchen Temperaturschwankungen die konkrete *M. condylurus*-Kolonie in ihrem Quartier ausgesetzt war, wurde im November 2016 die Temperatur mittels iButton Logger für fünf Tage in der entsprechenden Hausdachöffnung im Dorf in Koffikro alle 30 min gemessen (Anhang, Abbildung 17).

Die Temperaturen schwankten zwischen 42°C am Tag und 25°C in der Nacht bei einer Luftfeuchtigkeit von 57-77 % (Abbildung 22). Das Wellblechdach, unter dem sich das Fledermausquartier befand, schien bei Sonneneinstrahlung zu einer starken Aufheizung des darunter liegenden Zwischenraums zu führen.

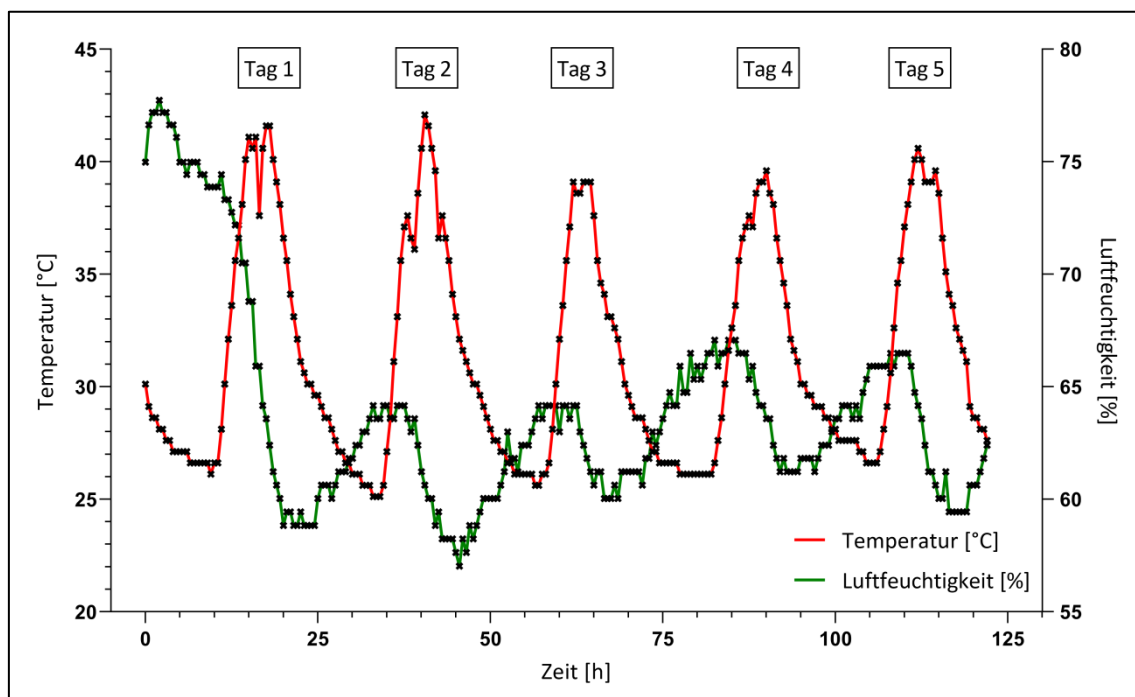


Abbildung 22: Messung der Umgebungstemperatur und Luftfeuchtigkeit im Quartier der Fledermauskolonie im Dorf Koffikro an der Elfenbeinküste

Temperatur- (rote Kurve) und Luftfeuchtigkeitsmessung (grüne Kurve) alle 30 min für fünf Tage.

Zur Untersuchung des Einflusses der Temperatur wurde das Zellwachstum und die Virusreplikation bei 27°C und 42°C gemessen, basierend auf den an der Elfenbeinküste vorherrschenden Temperaturbereichen (Abschnitt 1.3.3.3) und den gemessenen Temperaturen im Quartier der Fledermauskolonie unter Berücksichtigung der besonderen Thermoregulation von *M. condylurus* (Abschnitt 1.3.3).

4.5.2 Temperaturabhängiges Wachstum und Viabilität von Zellkulturen

Folgende *M. condylurus*-Zellkulturen wurden für 96 h bei 27°C, 37°C (Kontrolle) und 42°C mit 5% CO₂ kultiviert und lichtmikroskopisch die Adhärenz der Zellen sowie morphologische Veränderungen beurteilt: MoKi, MoTra Prim, MoLu Prim und MoBra Prim (Abbildung 23, rote Box). Zum Vergleich wurden Kultivierungsversuche mit HEK293-, HeLa- und Vero UNC-Zellen vorgenommen. Alle *M. condylurus*-Zellen tolerierten sowohl 27°C als auch 42°C. Die Zellen blieben adhärent und es war keine übermäßige Ablösung abgestorbener Zellen zu beobachten. Bei 42°C waren die Zellen im Vergleich zu 37°C vergrößert. Bei 27°C fielen ausschließlich MoKi-Zellen mit einer veränderten Morphologie auf: Die Zellen erschienen abgerundet.

Die Vergleichszellen HEK293-, HeLa- und Vero UNC tolerierten größtenteils weder 27°C noch 42°C als Wachstumstemperatur: Der Großteil der Zellen verlor die Adhärenz und löste sich von der Zellkulturoberfläche ab, so dass nur wenige Bereiche mit adhären Zellen mikroskopiert werden konnten (Abbildung 23). Für HeLa- und Vero UNC-Zellen konnten bei 42°C keine adhären Zellen mehr nach 96 h identifiziert werden. Vero UNC-Zellen verloren bei 27°C zwar nicht die Adhärenz, allerdings schienen sie zu mehrkernigen Riesenzellen zu fusionieren.

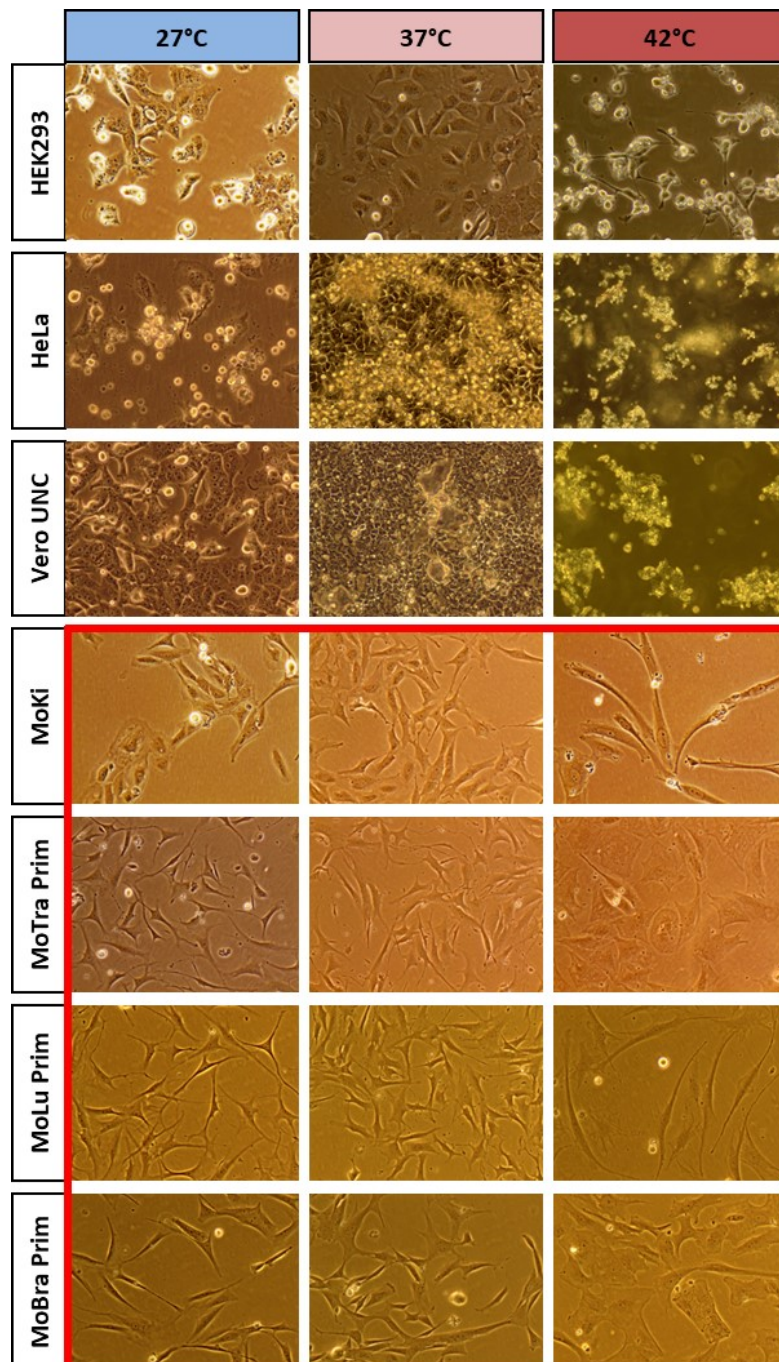


Abbildung 23: Wachstum verschiedener Zellkulturen bei 27°C, 37°C und 42°C

Rote Box: Ausgewählte Zellkulturen von *M. condylurus*. Vergleichs-Zellkulturen: HEK293, HeLa und Vero UNC. Phasenkontrastmikroskopie: alle Aufnahmen 40 x; 96 h Inkubation bei entsprechender Temperatur.

Für HEK293-, MoKi-, MoTra Prim-, MoLu Prim- und MoBra Prim-Zellen wurde darüber hinaus das Zellwachstum und die Viabilität über 96 h bei 27°C, 37°C und 42°C untersucht, wobei nach 96 h eine 80-90 %ige Konfluenz erreicht

wurde. Da sich HEK293-Zellen nach 72 h bei 27°C oder 42°C verstärkt von der Zellkulturoberfläche ablösten, wurden hier auch die nicht-adhärenenten Zellen im Medium für die Zellzahl- und Viabilitätsbestimmungen berücksichtigt.

Zur Beurteilung des Zellwachstums sollten sich die Zellen möglichst lange in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Nach 48 h und 96 h wurde jeweils für drei Wells pro Zellkultur und pro Temperatur mittels automatisierten Zellzählers die Gesamtzellzahl und Viabilität der Zellen bestimmt (Anhang, Abbildung 18).

Es konnte ein Zellwachstum für alle untersuchten Zellkulturen bei 27°C, 37°C und 42°C über den Zeitraum von 96 h beobachtet werden. Die Viabilität lag für alle getesteten Zellkulturen bei allen Temperaturen nach 96 h zwischen 80-97 %, wobei MoLu Prim- und MoBra Prim-Zellen bei allen drei Temperaturen die höchsten Viabilitätswerte erreichten. Obwohl die HEK293-Zellen die Adhärenz verloren, schienen sie zumindest im untersuchten Zeitraum noch vital zu sein und sich in der Suspension zu vermehren.

Insgesamt zeigten die mikroskopischen Untersuchungen, dass die getesteten Primärzellen und immortalisierten Zellen von *M. condylurus* toleranter gegenüber hohen und niedrigen Wachstumstemperaturen im Vergleich zu HEK293-, HeLa- und Vero UNC-Zellen waren. Die Zellen blieben adhärenent und zeigten eine hohe Viabilität bei 27°C, 37°C und 42°C.

4.5.3 Langzeitadaptation von *M. condylurus*-Zellen an 27°C und Veränderungen des NPC1-Rezeptor-Expressionlevels

Um eventuelle Temperaturadaptationen und mögliche Einflüsse auf die ebolavirale Replikation (Abschnitt 4.5.4) zu untersuchen, wurden MoKi-Zellen 147 Tage bei 27°C inkubiert. MoKi-Zellen wurden ausgewählt, da diese Zellen kloniert wurden und daher bei 37°C auch über lange Zeiträume konstante NPC1-Rezeptor-Expressionslevel aufwiesen. Die Zellen erreichten alle 10-14 Tage 100 % Konfluenz und wurden insgesamt elf mal passagiert. Die so adaptierte Zelllinie wurde fortan als MoKi_LT (*MoKi Low Temperature*) bezeichnet (Anhang, Abbildung 19).

Für den Vergleich der NPC1-Rezeptor-Expressionslevel wurden MoKi- und MoKi_LT-Zellen mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. Dabei waren deutliche Unterschiede erkennbar (Abbildung 24): MoKi_LT-Zellen zeigten ein deutlich höheres NPC1-Rezeptor-Expressionslevel als MoKi-Zellen. Darüber hinaus fiel auf, dass bei MoKi-LT besonders große Mengen an NPC1-Rezeptor im Bereich des Zellkerns lokalisiert waren (Abbildung 24C,D).

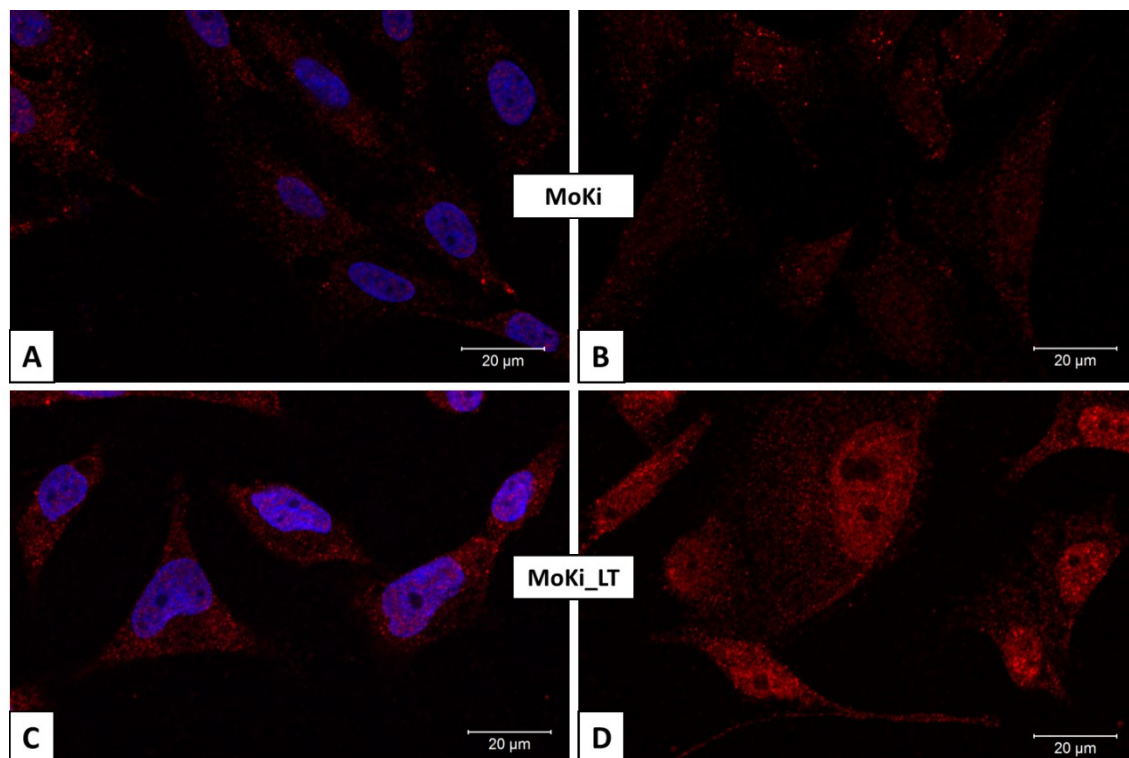


Abbildung 24: Vergleich des NPC1-Rezeptor-Expressionslevels in MoKi- und MoKi_LT-Zellen

NPC1-Rezeptor-Expression in MoKi-Zelllinie (A und B) und MoKi-Zellen, die 147 Tage bei 27°C inkubiert wurden (MoKi_LT, C und D). Gefärbter NPC1-Rezeptor (rot), Zellkerne (blau). B und D: ohne Färbung des Zellkerns.

4.5.4 Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Virusreplikation von EBOV und MARV

4.5.4.1 Virusreplikation bei konstanter Inkubation der Zellen bei 27°C, 37°C und 42°C

HEK293-, MoKi, MoBra Prim und MoLu Prim-Zellen wurden wie in 3.3.10 und 4.3 beschrieben als Triplikate in 6-well Platten ausgesät, von jeder Zellkultur je

eine Platte bei 27°C, 37°C und 42°C mit 5% CO₂ inkubiert und mit EBOV infiziert. Um zu untersuchen, ob eventuelle Temperatureffekte Ebolavirus-spezifisch sind oder auch bei anderen Filoviren auftreten, wurden MoKi-Zellen darüber hinaus mit MARV infiziert. Die Probennahme und Quantifizierung der viralen RNAs erfolgte für alle Zellkulturen nach 96 h wie in Abschnitt 3.4.2 und 3.4.3 beschrieben. In Abbildung 25 ist der Einfluss der Temperatur auf die filovirale Virusreplikation zu erkennen: Nach Infektion mit EBOV oder MARV war für alle getesteten Zellkulturen die Replikationsrate bei 27°C deutlich geringer als bei 37°C.

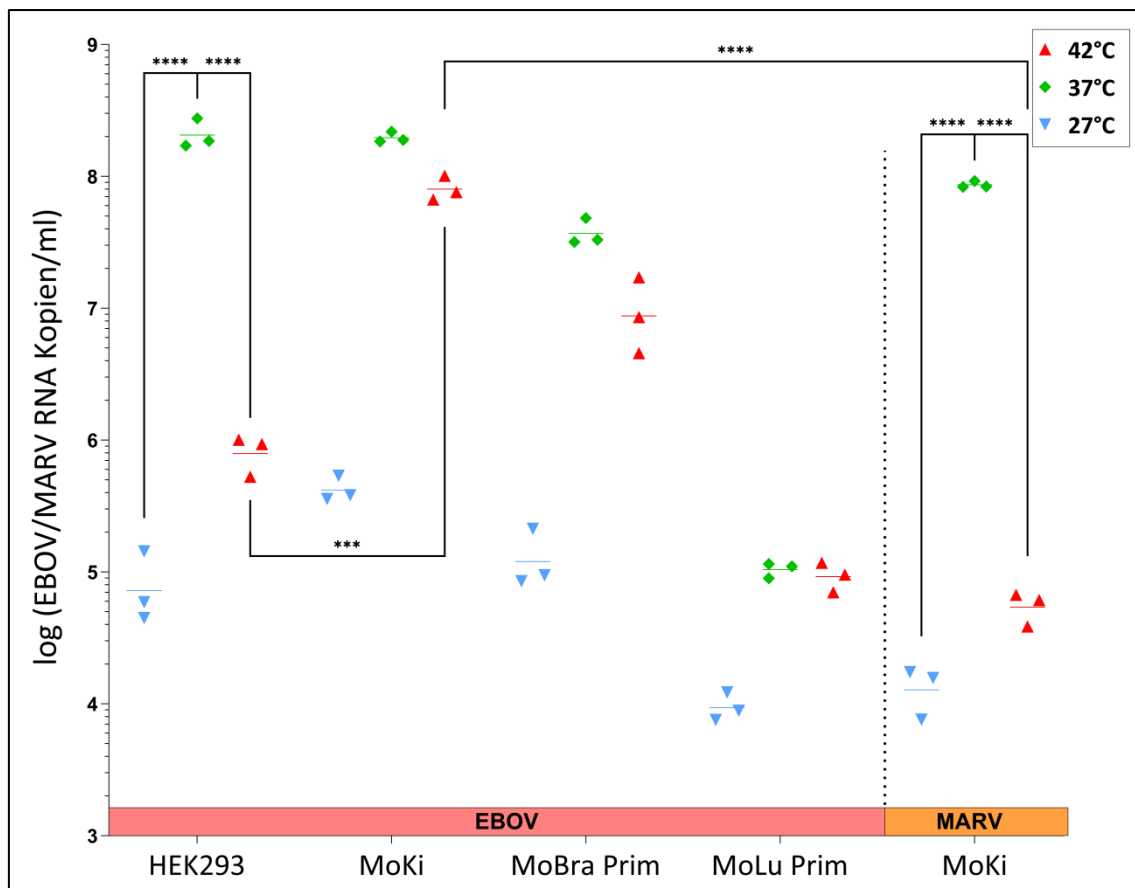


Abbildung 25: EBOV- und MARV-Replikation bei unterschiedlichen konstanten Temperaturen

Kopienzahl viraler RNAs pro ml in Zellkulturüberständen nach 96 h Inkubation bei 27°C (blau), 37°C (grün) oder 42°C (rot). Infektion mit EBOV: HEK293, MoKi, MoBra Prim und MoLu Prim. Infektion mit MARV: MoKi. Die horizontalen Linien indizieren das geometrische Mittel der Messwerte. Signifikante Unterschiede (**** = $P < 0,0001$; *** = $P < 0,001$).

HEK293-Zellen zeigten bei Infektion mit EBOV und Inkubation bei 27°C oder 42°C eine signifikant geringere Replikationsrate als bei 37°C. Bei MoKi-Zellen war die Replikationsrate bei 42°C signifikant höher als bei HEK293-Zellen. Bei MoKi- und MoBra Prim-Zellen führten Inkubationstemperaturen von 42°C im Vergleich zu HEK293-Zellen nur zu einem geringen Abfall der EBOV-Replikationseffizienz. In MoLu Prim-Zellen erfolgte die Replikation bei 42°C auf einem vergleichbar niedrigem Niveau wie bei 27°C und 37°C. Die Virusreplikationsrate in MoKi-Zellen bei 42°C war bei MARV signifikant geringer als bei EBOV.

Um darüber hinaus zu untersuchen, ob es in MoKi_LT-Zellen zu Temperaturadaptationen gekommen war, die die ebolavirale Replikation beeinflussen, wurden auch diese Zellen mit EBOV infiziert und die Virusreplikationsrate mit MoKi-Zellen verglichen (Anhang, Abbildung 20). MoKi_LT-Zellen zeigten eine geringfügig höhere EBOV-Replikationsrate im Vergleich zu MoKi-Zellen nach 96 h Inkubation bei 27°C.

4.5.4.2 Wechsel der Inkubationstemperatur und Einfluss auf die EBOV-Replikationskinetik

Im folgenden Abschnitt wurde untersucht, ob EBOV längere Zeiträume bei niedrigeren Temperaturen überdauern kann und ob bei einem Temperaturanstieg ein Anstieg der Replikationsrate zu beobachten ist. Dafür wurde mit MoLu Prim- und MoBra Prim-Zellen getestet, ob nach siebentägiger Inkubation bei 27°C und einem anschließenden Anstieg auf 37°C die EBOV-Replikationsrate ebenfalls ansteigt. Zum Vergleich wurde für beide Zellkulturen je eine Zellkulturplatte kontinuierlich bei 27°C und 37°C inkubiert. An Tag 0, 4, 7, 9, 11, 14, 16, 18 und 21 erfolgte die Probennahme und Quantifizierung der viralen RNAs in den Zellkulturüberständen wie zuvor beschrieben. Bei den Zellkulturplatten mit wechselnder Temperatur von 27°C auf 37°C begann die Probennahme an Tag 7.

In Abbildung 26 ist die Temperaturabhängigkeit der EBOV-Replikationsrate zu erkennen. In MoLu Prim-Zellen erfolgte die Virusreplikation bei 27°C auf einem deutlich niedrigeren Niveau als bei 37°C. An Tag 21 konnten bei 27°C im Mittel $2,9 \times 10^6$ und demgegenüber bei 37°C $1,7 \times 10^8$ EBOV RNA Kopien/ml

detektiert werden. Die Replikation in MoBra Prim-Zellen erfolgte auf einem höheren Niveau als in MoLu Prim-Zellen. Es zeigte sich dieselbe Temperaturabhängigkeit wie bei MoLu Prim, nur dass die Menge viraler RNAs in den Zellkulturüberständen zwischen Tag 16 und 18 für alle untersuchten Temperaturen ein vergleichbar hohes Niveau oberhalb von $5,7 \times 10^8$ EBOV RNA Kopien/ml erreichte. Bei einem Temperaturwechsel von 27°C auf 37°C an Tag 7 konnte im Vergleich zu den jeweiligen bei 27°C inkubierten Kontrollzellen eine deutliche Erhöhung der Virusreplikationsrate in MoLu Prim- und MoBra Prim-Zellen beobachtet werden (Abbildung 26, gestrichelte Linien).

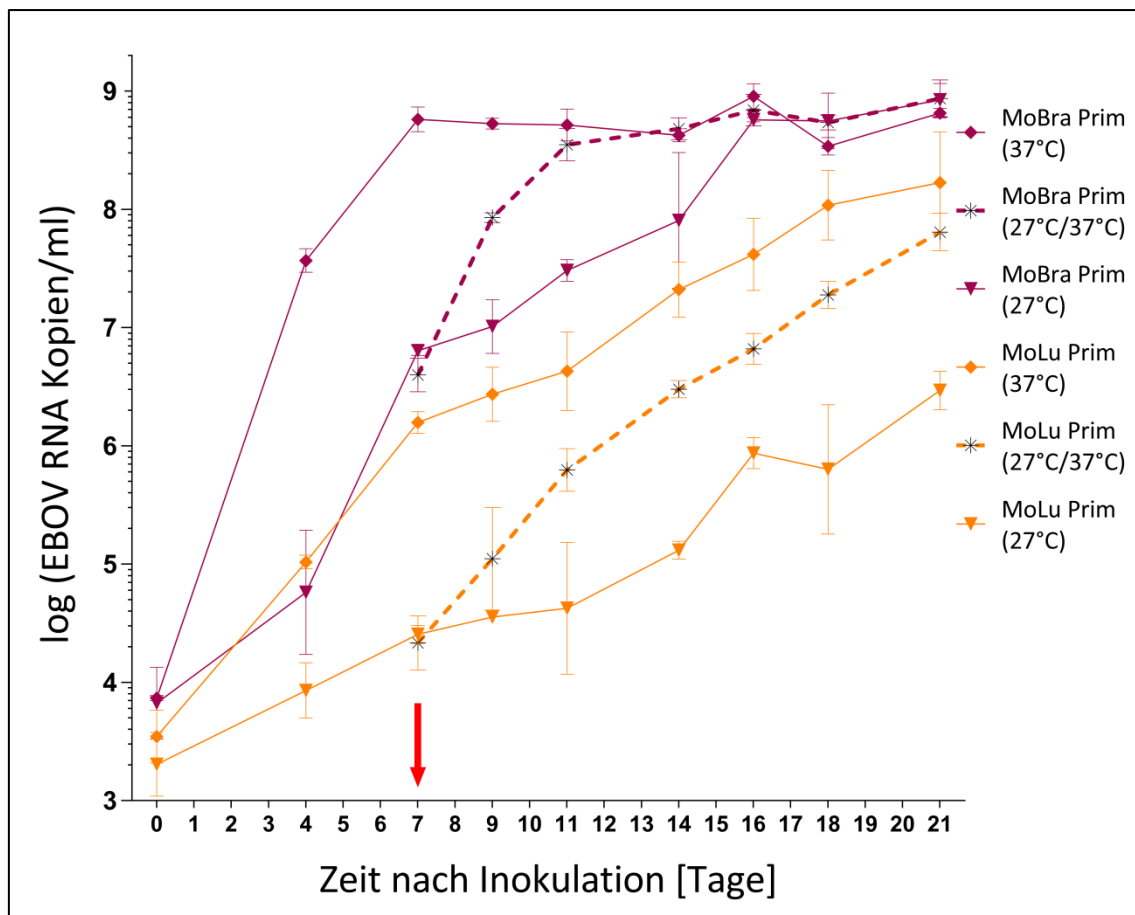


Abbildung 26: EBOV-Replikationskinetik bei Wechsel der Inkubationstemperatur

Kopienzahl viraler RNAs pro ml in Zellkulturüberständen. Inkubation von MoLu Prim- (orange) und MoBra Prim-Zellen (violett): kontinuierlich bei 27°C (Dreieck), kontinuierlich bei 37°C (Raute), Wechsel von 27°C auf 37°C (Stern, gestrichelte Linie). Roter Pfeil: Zeitpunkt des Temperaturwechsels (Tag 7).

Wie in 4.3.1 beschrieben, wurde die x-fache Vermehrung der ebolaviralen RNA zwischen Tag 7 und Tag 11 (96 h) berechnet (Tabelle 9). In MoLu Prim-Zellen ergab sich bei konstanter Inkubationstemperatur von 27°C ein Vermehrungsfaktor von 3 x, in MoBra Prim-Zellen von 5 x. Die Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 37°C führte zu einer Erhöhung des Vermehrungsfaktors auf 28 x bei MoLu Prim- und 88 x bei MoBra Prim-Zellen.

Tabelle 9: x-fache Vermehrung der ebolaviralen RNA bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen

Zellkultur	Inkubationstemperatur [°C]	x-fache Vermehrung der ebolaviralen RNA
MoLu Prim	27	3
MoLu Prim	27/37	28
MoBra Prim	27	5
MoBra Prim	27/37	88

Für die Berechnung der x-fachen Vermehrung der ebolaviralen RNA wurden die Zeitpunkte Tag 7 und 11 nach Infektion herangezogen.

Analog wurden auch MoKi-Zellen mit EBOV und MARV infiziert und identischen Temperaturwechseln ausgesetzt: Eine Erhöhung der Inkubationstemperatur von 27°C auf 37°C führte auch hier zu einer Erhöhung der Virusreplikationsrate (Daten aus Übersichtsgründen nicht in Abbildung 26 eingebunden). Allerdings tolerierten mit MARV infizierte MoKi-Zellen den Temperaturwechsel schlechter und lösten sich vollständig von der Zellkulturoberfläche ab. HEK293-Zellen tolerierten die Inkubation bei 27°C nicht, so dass an Tag 4 nach Infektion mit EBOV nur noch wenige adhärente Zellen zu beobachten waren. Nach dem Temperaturwechsel lösten sich die übrigen Zellen von der Zellkulturoberfläche ab und eine Erhöhung der Virusreplikationsrate konnte nicht beobachtet werden. Demgegenüber konnten MoLu Prim- und MoBra Prim-Zellen über 21 Tage nach Infektion mit EBOV bei 27°C, 37°C und auch bei 42°C ohne Verlust der Adhärenz inkubiert werden (Anhang, Abbildung 21). Bei allen getesteten Temperaturen konnte eine deutliche Virusreplikation beobachtet werden. Auch bei fünfmaligem Wechsel der Inkubationstemperatur zwischen 27°C und 42°C blieben die Zellen adhärent (dargestellt für MoLu Prim-Zellen: Anhang, Abbildung 22) und konnten nach 21 Tagen weiter passagiert werden.

5 Diskussion

5.1 Langzeithaltung und metagenomische Analyse von Proben von *M. condylurus*

Nach Konstruktion einer Fledermaushaltungsanlage an der Elfenbeinküste, Fangen der Fledermäuse, erfolgreicher Umstellung der Tiere auf Mehlwürmer als Nahrungsquelle in Gefangenschaft und molekularer Bestätigung der Spezies als *M. condylurus*, konnten 20 Tiere in einer elfmonatigen Langzeitstudie regelmäßig beprobt und metagenomische Analysen von Oralabstrich- und Urinproben durchgeführt werden.

Metagenomanalysen haben gezeigt, dass Chiroptera eine Vielzahl von Viren beherbergen [292-294]. In *M. condylurus* ist dies die erste durchgeführte Viromstudie, wobei eine weitere Besonderheit der Studie darin bestand, dass sich die Fledermäuse über einen langen Zeitraum in kontrollierter Umgebung in Haltung befanden. Dadurch sollte erstmals der zeitliche Verlauf der Virusausscheidungen und mögliche Assoziationen mit Faktoren wie Stress, Hunger oder Trächtigkeit untersucht werden. Innerhalb der 100 Treffer (Oralabstrichproben) bzw. 60 Treffer (Urinproben) mit der größten *Coverage* wurden jeweils 8 % der Treffer mit Ähnlichkeiten zu Vertebraten-infizierenden Viren für die weitere Analyse genutzt. Dabei erfolgten ausschließlich Klassifizierungen zu Viren mit Ähnlichkeiten zu *Corona*-, *Adeno*-, *Herpes*- und *Genomoviridae*, wobei Letztere nur in den Urinproben festgestellt werden konnten. Auch in anderen Studien wurden mittels NGS *Corona*- [294-296], *Adeno*- [296-299] und *Herpesviridae* [294, 296, 299-302] in unterschiedlichsten Chiroptera-Familien gefunden. In einer *Screening*-Studie wurden Coronaviren auch in Fledermäusen der Art *M. condylurus* detektiert [303].

Bei der Familie *Genomoviridae* mit der Gattung *Gemycircularvirus*, welche erst 2016 von der ICTV eingeführt wurde, handelt es sich um DNA-Viren mit einem zirkulären, einzelsträngigen Genom [304]. Sequenzen mit Zuordnung zu Gemycircularviren wurden im Flughund *Pteropus tonganus* [305], anderen Mammalia, aber auch in Vögeln, Insekten, Pflanzen, Pilzen und im Abwasser gefunden, wobei eine definitive Zuordnung von Wirt und assoziierten

Symptomen bei Infektion noch nicht vorliegt [306]. In einer metagenomischen Studie in Französisch-Guyana wurden in Fäzes und Speichel der Fledermausspezies *Desmodus rotundus* und *Molossus molossus* ebenfalls Sequenzen mit Zuordnung zu *Genomoviridae* detektiert [307].

Gegenüber anderen metagenomischen Analysen bei Fledermäusen war der prozentuale Anteil der mit Ähnlichkeiten zu eukaryotischen Viren klassifizierten *Reads* in den Urinproben etwas geringer und in den Oralabstrichproben vergleichbar zu anderen Studien: Beispielsweise betrug der Anteil der *Reads* mit Ähnlichkeiten zu *Coronaviridae* in den Oralabstrichproben 0,004 %, bei einer anderen Studie 0,005 % in Fäzesproben [293] oder 0,004 % in Oral- und Analabstrichproben von Chiroptera [308].

Die beobachtete Zunahme des relativen Fledermausgruppengewichts in den ersten 35 Wochen (Abbildung 8; Abbildung 9), lässt sich durch das Nahrungsüberangebot und die reduzierte Bewegung der Fledermäuse in Gefangenschaft erklären. Die Abnahme des relativen Fledermausgruppengewichts ab Woche 36 und das Versterben von 60 % der Tiere kann vielfältige Ursachen haben und wurde nicht weiter untersucht. Möglicherweise waren für das Versterben der Fledermäuse auch Bakterieninfektionen verantwortlich, was ebenfalls für Chiroptera beschrieben wurde [309, 310].

Um die zeitliche Komponente der Virusausscheidungen zu untersuchen, wurde die Summe aller klassifizierten *Reads* einer Virusfamilie zum jeweiligen Zeitpunkt gebildet. Da *Reads* mit Ähnlichkeiten zu *Corona*-, *Adeno*- und *Herpesviridae* in nahezu allen Proben über den gesamten Verlauf der Langzeithaltung im Maul und im Urin der Fledermäuse nachgewiesen werden konnten, schienen diese Viren kontinuierlich in der Gruppe der untersuchten Tiere aufzutreten. Dass ein Nachweis in einigen Urinproben nicht möglich war, aber in den Oralabstrichenproben zu jeden Zeitpunkt, könnte darin begründet liegen, dass weniger Virus in den Urin abgegeben wird. Darüber hinaus wurden zwar die Oralabstrichproben, nicht aber die Urinproben, von jedem Tier individuell genommen. Sollte ein infiziertes Tier nicht vor der Probennahme uriniert haben, hätte dies ebenfalls die Detektionsergebnisse beeinflusst. Die

Effizienz des Aufreinigungsprotokolls und die Anreicherung der viralen RNAs wurde durch Spiken einer definierten Menge Influenza-A-Virus in zwei Proben überprüft und nachgewiesen.

Für *Adenoviridae* war ein Peak mit einer ca. 45 x Erhöhung der *Read*-Anzahl im Vergleich zur Vorwoche in den Urinproben zu beobachten; in einem Zeitraum, in dem vier Fledermäuse der Gruppe trächtig waren (Abbildung 9). Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Trächtigkeit der Tiere und verstärkter Detektion von adenoviralen *Reads* zu untersuchen, müssten die individuellen Proben der trächtigen Tiere rückgetestet werden. Auf bestimmte Auslöser hin könnte die Virusvermehrung der *Genomoviridae* zumindest in einigen Tieren stimuliert worden sein, was zur beobachteten 1878-fachen Erhöhung der detektierten *Reads* in Woche 21 im Vergleich zur Vorwoche führte. Für eine genauere Analyse der zeitlichen Komponente der Virusausscheidungen waren die bisherigen bioinformatischen Daten noch nicht ausreichend.

Da die Fledermausvolieren zusätzlich durch einen äußeren Käfig abgeschirmt wurden (Anhang, Abbildung 1), kann das Eintragen von Viren in die untersuchte Fledermausgruppe durch andere Tiere ausgeschlossen werden. Auch eine Übertragung von Viren auf die Fledermäuse über Arthropoden wurde für die untersuchten Virusfamilien bisher nicht beschrieben [311]. Die Fledermäuse waren daher höchstwahrscheinlich bereits zu Beginn der Studie infiziert und *Corona*-, *Adeno*-, *Herpes*- und *Genomoviridae* wurden kontinuierlich von der Fledermausgruppe ausgeschieden. Um zu untersuchen, ob die beobachteten Viruspeaks viele oder nur vereinzelte Tiere der Gruppe betreffen, müssten in weiteren Untersuchungen die individuellen Proben für jedes Tier am jeweiligen Probentag rückgetestet werden.

Desweiteren sei angemerkt, dass es sich bei *Adeno*-, *Herpes* und *Genomoviridae* um DNA-Viren handelt: Da alle Proben mit zwei unterschiedlichen DNasen behandelt wurden, ist ein unvollständiger DNA-Abbau unwahrscheinlich. Vermutlich erfolgte der Nachweis der viralen Transkripte dieser Viren, was quantitative Aussagen erschweren würde. Denn eine größere Anzahl *Reads* in einer Probe könnte außer durch Virusvermehrung auch durch eine verstärkte Transkription hervorgerufen

worden sein. Abschließend sei angemerkt, dass in einer anderen Studie die Umstellung der Fledermäuse auf Mehlwürmer als Nahrungsquelle einen unmittelbaren Einfluss auf das Mikrobiom der Tiere hatte [312], was ebenfalls einen Einfluss auf das in dieser Studie untersuchte Virom haben könnte [313, 314].

Die Analyse der Proben mittels NGS ermöglichte die Suche und Detektion noch unbekannter Viren von *M. condylurus*, deren Nukleinsäuresequenzen nur eine gewisse Ähnlichkeit zu den Virussequenzen in der *RefSeq*-Datenbank besitzen. Demgegenüber kann mit *Screening*-PCRs nur nach Gruppen von Viren mit zumindest z.T. bekannten Nukleinsäuresequenzen gesucht werden. Um einen ersten Einblick in das Virom in Ausscheidungen von *M. condylurus* zu erhalten, war die durchgeführte NGS-Studie *Screening*-PCRs nach bestimmten Viren überlegen. Um jedoch den zeitlichen Verlauf der Virusausscheidungen während der Langzeithaltung der Fledermäuse im Detail zu untersuchen, waren die NGS-Daten nicht ausreichend. Für alle Viren in den detektierten Virusfamilien müssten für eine weitergehende Analyse alle klassifizierten *Reads* zu *Contigs* assembliert werden. Durch ein *Mapping* aller *Reads* gegen diese *Contigs*, könnten womöglich zusätzlich *Reads* selektiert werden, die aufgrund der Abweichungen zu bekannten Virussequenzen vorher nicht klassifiziert wurden.

Die ermittelten Partialsequenzen aus *M. condylurus* könnten durch Sangersequenzierungen verifiziert werden. Anschließend könnte durch die Entwicklung spezifischer qPCRs eine Quantifizierung mit hoher Spezifität und Sensitivität in den Einzelproben vorgenommen werden, um exaktere Aussagen zum Auftreten der Viren während der Langzeithaltung treffen zu können. Auch eine Beurteilung möglicher Assoziationen der zeitlichen Virusausscheidungen mit Faktoren wie Stress, Hunger oder Trächtigkeit ist erst mit spezifischen qPCRs möglich.

5.2 Primärzellkulturen von *M. condylurus* und NPC1-Rezeptor-Expressionslevel

Humane Primärzellen, insbesondere primäre Immunzellen, wurden vielfach in der Ebolavirusforschung verwendet [36, 45, 315-322]. Untersuchungen zu EBOV *Entry*- und Infektionsprozessen in Chiroptera-Zellen wurden hingegen vornehmlich mit immortalisierten Zelllinien durchgeführt [180, 323-331]. Ein Nachteil bei der Verwendung von immortalisierten Zelllinien besteht in ihren genetischen und phänotypischen Unterschieden im Vergleich zu den entsprechenden Ursprungszellen im Organ, wohingegen Primärzellen noch zahlreiche wichtige Marker und Zellfunktionen innehaben, die auch *in vivo* beobachtet werden können [266, 332, 333]. Um ein aussagekräftigeres Zellkultur-Modellsystem von der potenziellen Reservoirspezies *M. condylurus* zu etablieren, wurden daher Primärzellkulturen und zum Vergleich ausgewählte immortalisierte Zelllinien aus verschiedensten Organen und Geweben von *M. condylurus*-Fledermäusen generiert.

5.2.1 Primärzellen mit niedriger Passagenzahl

Fortlaufendes Passagieren der Primärzellkulturen führte zu einem Verlust an Zelldiversität, welcher vermutlich durch Selektionsprozesse unter den Zellkulturbedingungen verursacht wurde [334, 335]. Auch die Morphologie und die NPC1-Rezeptor-Expressionslevel änderten sich bei einigen Zellen im Verlauf der Passagen deutlich. So zeigte die Mehrheit der MoSp Prim-Zellen mit niedriger Passagenzahl sehr geringe NPC1-Rezeptor-Expressionslevel. Durch das Passagieren wurde ein seltener Zelltyp mit abweichender Morphologie und hohem NPC1-Rezeptor-Expressionslevel angereichert (Anhang, Abbildung 12). Diese Selektion von Subpopulationen von Zellen wurde auch für Zelllinien beschrieben [336]. Um eine ausreichend hohe Zellzahl für die durchflusszytometrische Messung von MoSp Prim-Zellen zu erhalten, waren zwei zusätzliche Passagen notwendig, in denen sich die Zusammensetzung der Primärzellkultur eklatant änderte und schließlich ein Zelltyp mit hohem NPC1-Rezeptor-Expressionslevel dominierte. Diese Ergebnisse spiegeln die mögliche drastische Veränderung der Charakteristika

einer Zellkultur in sehr kurzer Zeit wieder. Die Veränderungen von Morphologie, Entwicklung, biologischen Charakteristika und Genexpression der Zellen bei Langzeitkultivierung von Zelllinien wurden vielfach beschrieben [337-342]. Da Primärzellen von Chiroptera nicht in großen Mengen verfügbar sind [266, 343], wird die überwiegende Mehrzahl von Zellkulturexperimenten in der Filovirusforschung mit immortalisierten Zelllinien durchgeführt, bei denen in vielen Fällen auch die Passagenzahl nicht berücksichtigt wird. Passagieren, Immortalisierung und Klonierung von Zellkulturen kann jedoch zu veränderten Zelleigenschaften führen, die nicht mehr charakteristisch für die Ursprungszellen *in vivo* sind. Eine Besonderheit der in dieser Doktorarbeit durchgeführten Experimente besteht in der überwiegenden Verwendung von Primärzellkulturen in niedrigen Passagenzahlen (< 10), die eine größtmögliche Ähnlichkeit zu den entsprechenden Zellen im Organ besitzen.

5.2.2 Spontane Immortalisierungen

Spontane Immortalisierungen stellen üblicherweise seltene Ereignisse dar, bei dem es zu einer „genomischen Instabilität“, also Chromosomen- oder Genmutationen kommen muss [344]. Während die spontane Immortalisierung von Zellkulturen ein äußerst seltenes Ereignis in humanen oder auch in Vogelzellen ist, werden spontane Immortalisierungen bei Zellen von Nagetieren oder auch von der Regenbogenforelle häufiger beschrieben [345-348]. Auch für Chiroptera-Zellen scheint die spontane Immortalisierung in Zellkultur normalerweise ein seltenes Ereignis darzustellen. Ein beschriebenes Beispiel hierfür ist die Lungenzelllinie CpLu aus der Fledermausspezies *Carollia perspicillata* [349]. Demgegenüber wurde beschrieben, dass keine der Primärzellkulturen, die aus 20 verschiedenen Organen des Flughundes *Pteropus alecto* etabliert wurden, spontan immortalisierte [350]. In dieser Hinsicht war es überraschend, dass die allermeisten Primärzellkulturen von *M. condylurus* spontan immortalisierten. Für fünf der Fledermauszellkulturen wurde gezeigt, dass selbst nach 35-70 Passagen keine Veränderungen der Wachstumsgeschwindigkeit zu beobachten waren. Ob Zellen von *M. condylurus* genetisch instabiler sind und daher leichter Mutationen akquirieren, veränderte

Telomeraseaktivitäten oder Zellzyklusregulationen aufweisen, oder ob somatische Stammzellpopulationen im Gewebe dieser Fledermäuse für die Entstehung der Zelllinien eine Rolle spielen [347, 351], muss in weiteren Studien untersucht werden.

5.2.3 NPC1-Rezeptor in *M. condylurus* und anderen Spezies

Kürzlich wurde gezeigt, dass NPC1-Sequenzvariationen in einigen Chiroptera-Spezies zu einer reduzierten GP-NPC1-Interaktion führen, wodurch die zelluläre Suszeptibilität von Chiroptera für Filoviren, der filovirale Replikationszyklus und die Virulenz beeinflusst wird [180]. Dabei führt der Austausch einer einzelnen Aminosäure von Asparaginsäure zu Phenylalanin in der zentralen Region der Domäne C von NPC1 an Position 502 dazu, dass Zellen des Flughundes *Eidolon helvum* refraktär gegenüber Infektionen mit EBOV sind [180]. *M. condylurus* zeigt keine D502F-Sequenzvariation, so dass NPC1 von *M. condylurus* wie das humane NPC1-Protein mit dem Ebola-GP-Protein interagieren sollte.

Daher wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, dass nicht nur NPC1-Sequenzvariationen, sondern auch die exprimierte Menge an NPC1-Protein in den Endo- und Lysosomen die Suszeptibilität für EBOV-Infektionen durch unterschiedliche Effektivität des *Entry*-Prozesses beeinflusst. Das primäre Ziel bestand zunächst darin, die NPC1-Rezeptor-Expressionslevel in Fledermaus-Primärzellkulturen zu untersuchen und später mögliche Einflüsse auf die EBOV-Replikationskinetik zu evaluieren. Beim Vergleich verschiedener Zellen wurde deutlich, dass das NPC1-Rezeptor-Expressionsprofil in Zellen aus der potenziellen Reservoirspezies *M. condylurus* deutlich unterschiedlich zu Wirtsspezies wie dem Menschen war, bei denen schwere Krankheitsverläufe beobachtet werden. Die allermeisten Zellkulturen von *M. condylurus* wiesen geringere NPC1-Rezeptor-Expressionslevel als die untersuchten humanen Zellkulturen, die Affenzellkultur und die Zellkulturen von der europäischen Fledermaus *N. noctula* auf. Die auffallend geringen NPC1-Rezeptor-Expressionslevel in den meisten Primärzellen von *M. condylurus* könnten das Ergebnis eines gegenseitigen Adaptationsprozesses von Ebolaviren und

M. condylurus darstellen. So könnte eine geringere Menge des zellulären Hauptrezeptors NPC1 Infektionen mit Replikation auf niedrigerem Niveau, möglicherweise ohne Zellzerstörungen und auch die Etablierung von persistenten Infektionen begünstigen. Ebenfalls wäre vorstellbar, dass das Expressionslevel von NPC1 in *M. condylurus* bereits ursprünglich niedrig war, so dass dadurch diese Fledermausspezies für Ebolaviren einen geeigneten Reservoirwirt darstellte.

Beim Abgleich mit der Datenbank *ProteomicsDB* [65] kann darüber hinaus festgestellt werden, dass die Menge an exprimiertem NPC1 in HeLa- oder HEK293-Zellen niedriger als in 32 anderen humanen Zelllinien wie A549 oder Hep G2 ist (Anhang, Abbildung 23). Beim Vergleich der Rangfolge der NPC1-Rezeptor-Expressionslevel in humanen Geweben fallen einige offensichtliche Unterschiede zu den getesteten Zellen von *M. condylurus* auf: So werden gemäß unterschiedlicher Datenbanken [65, 68-70] die NPC1-Rezeptor-Expressionslevel in humanem Hoden als hoch im Vergleich zu anderen humanen Geweben klassifiziert. Demgegenüber war das Expressionslevel in Hodenzellen von *M. condylurus* im Vergleich zu Zellen aus anderen getesteten Geweben gering. Umgekehrt sind die NPC1-Rezeptor-Expressionslevel im humanen Gehirn sehr gering [65], während in Gehirnzellen von *M. condylurus* im Vergleich zu Zellen aus anderen Geweben dieser Fledermausspezies relativ hohe Expressionslevel detektiert werden können. Abweichende NPC1-Rezeptor-Expressionslevel in den Organen der möglichen Reservoirspezies *M. condylurus* im Vergleich zum Menschen könnten auch zu einem veränderten Organotropismus im natürlichen Wirt beitragen.

Der Transport von Sterolen innerhalb von Zellen wird durch mehrere verschiedene Mechanismen realisiert, die simultan ablaufen: Dazu gehört der Transport über Vesikel, die *Carrier*-vermittelte Diffusion oder auch der direkte Kontakt zwischen zwei Membranen [352, 353]. Obwohl die Mechanismen des intrazellulären Cholesteroltransports in Chiroptera noch nicht erforscht sind, kann dennoch angenommen werden, dass die außerordentlich geringen NPC1-Rezeptor-Expressionslevel in vielen Zelltypen von *M. condylurus* ausreichend sind, um alle Funktionen des Cholesteroltransports zu

übernehmen, so dass die Fledermäuse keine Erkrankung wie die Niemann-Pick-Krankheit entwickeln. Da NPC1 ein evolutionär hochkonserviertes Protein darstellt, welches sogar in primitiven Eukaryoten wie Grünalgen, Pilzen oder Insekten vorhanden ist [354, 355] (Anhang, Abbildung 11B), wäre es nicht plausibel, wenn sich ein alternatives Cholesteroltransportprotein in Chiroptera entwickelt hätte.

5.3 Replikation von EBOV in Zellen von *M. condylurus*

5.3.1 Korrelation zwischen NPC1-Rezeptor-Expressionslevel und EBOV-Replikationsrate

Nur wenige Studien sind in der Literatur beschrieben, bei denen Infektionsversuche mit Filoviren und Primärzellen von Chiroptera durchgeführt wurden: Zu den wenigen Beispielen zählen Infektionsversuche mit Nierenprimärzellen von *Artibeus jamaicensis* [323]. Nach aktuellem Kenntnisstand gibt es darüber hinaus keine anderen Studien in der Literatur, in denen der Zusammenhang zwischen NPC1-Rezeptor-Expressionslevel und EBOV-Replikationsrate untersucht wurde. In Abbildung 27 wurden die Ergebnisse zur Charakterisierung der NPC1-Rezeptor-Expression (Tabelle 7) und die Virusreplikationsraten von EBOV (Tabelle 8) in 15 ausgewählten Zellkulturen gegenübergestellt. Besonders niedrige NPC1-Rezeptor-Expressionslevel konnten für MoTra Prim, MoLu Prim, MoSp Prim Early und MoKi Prim-Zellen gemessen werden. Gleichzeitig zeigten diese vier Primärzellkulturen auch niedrige Virusreplikationsraten innerhalb der ersten 96 h nach Infektion mit EBOV. Demgegenüber konnten besonders hohe NPC1-Rezeptor-Expressionslevel in HeLa-, HEK293- und Vero UNC-Zellen nachgewiesen werden und gleichzeitig wurden in diesen Zellen auch sehr hohe Virusreplikationsraten beobachtet. Die NPC1-Rezeptor-Expressionslevel sowie die Virusreplikationsraten in MoBra Prim- und MoTes Prim-Zellen wurden ebenfalls übereinstimmend als „mittel“ klassifiziert. Die Kontrollzellen HEK293ΔNPC1 waren wie erwartet refraktär gegenüber Infektionen mit EBOV, da ihnen der zelluläre Rezeptor NPC1 fehlt. Für die meisten untersuchten

Zellkulturen schien sich folglich eine gewisse Korrelation zwischen der Menge an exprimiertem NPC1-Rezeptor und der Virusreplikationsrate von EBOV herauszukristallisieren.

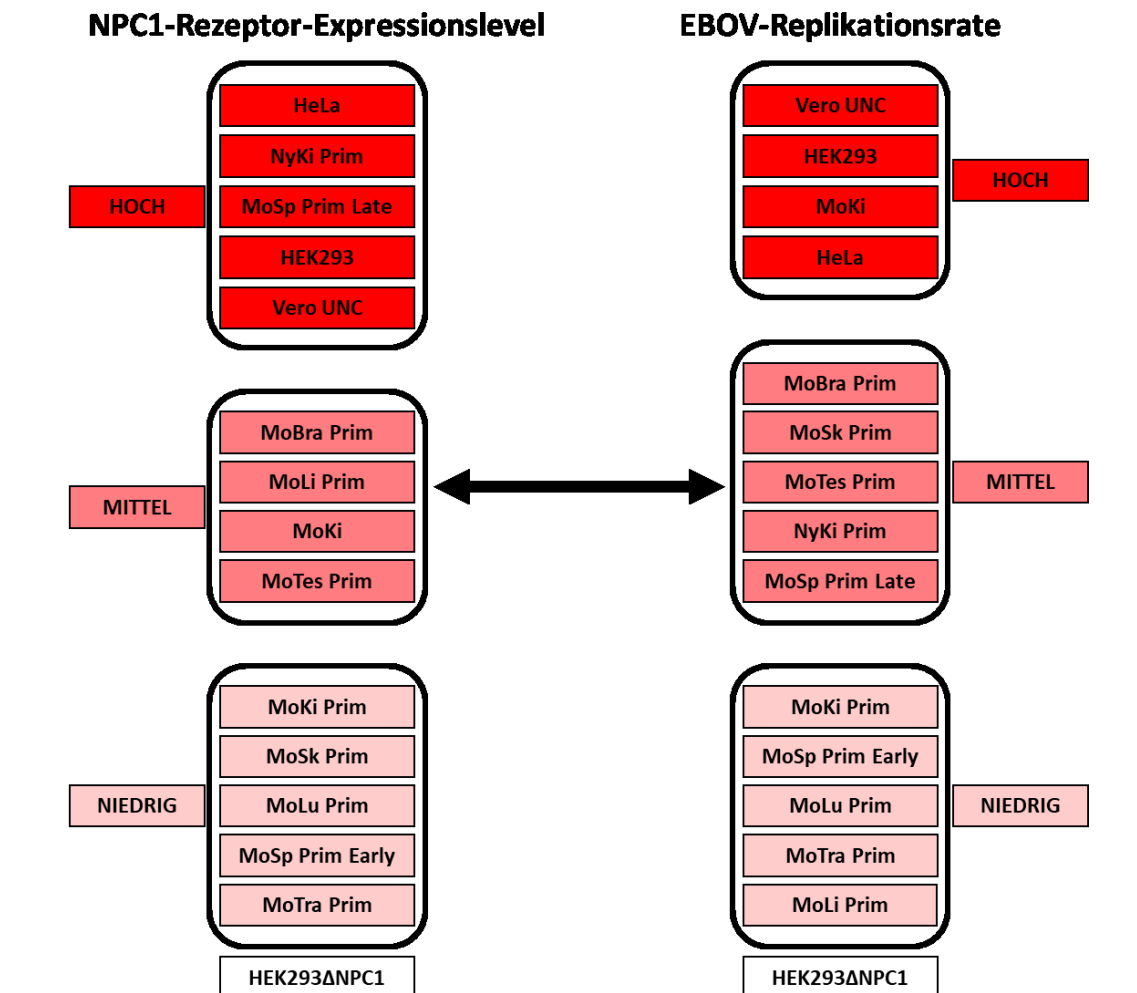


Abbildung 27: Gegenüberstellung von NPC1-Rezeptor-Expressionslevel und EBOV-Replikationsrate

Basierend auf den Versuchsergebnissen zur Charakterisierung der NPC1-Rezeptor-Expression (Tabelle 7) und der Virusreplikationsrate von EBOV (Tabelle 8) bei 15 ausgewählten Zellkulturen.

Beim Vergleich von primären Milzzellen in Passage 5 (MoSp Prim Early) mit niedriger NPC1-Rezeptor-Expression und Milzzellen in Passage 29 (MoSp Prim Late) mit hoher NPC1-Rezeptor-Expression (Anhang, Abbildung 12) konnte diese Korrelation tendenziell bestätigt werden.

Die gemessene Menge ebolaviraler RNA korrelierte auch mit der Menge infektiöser Viruspartikel in den Zellkulturüberständen (Abbildung 15). Auffallend war, dass MoBra Prim-Zellen trotz hohen RNA-Titers nur einen geringen Virustiter auf dem Niveau von MoTra Prim-Zellen zeigten. Die Effizienz zur Bildung infektiöser Viruspartikel und damit verbunden vermutlich auch der Anteil an DI-Partikeln scheinen in den einzelnen Zellkulturen zusätzlich zu variieren.

In einigen Zellkulturen konnten Abweichungen von der beobachteten Korrelation zwischen dem NPC1-Rezeptor-Expressionslevel und der EBOV-Replikationsrate festgestellt werden. So zeigten MoSk Prim-Zellen trotz niedriger NPC1-Rezeptor-Expression Virusreplikationsraten auf mittlerem Niveau und NyKi Prim-Zellen umgekehrt mittlere Virusreplikationsraten trotz hoher NPC1-Rezeptor-Expressionslevel. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der NPC1-Rezeptor zwar eine wichtige Schlüsselkomponente, allerdings nicht der einzige Wirtszellfaktor ist, der den filoviralen Replikationszyklus beeinflusst. So sind zusätzlich zu NPC1 verschiedenste weitere Wirtszellfaktoren für das *Attachment* und den *Entry*-Prozess essentiell [30, 33-48]. Das erklärt auch, dass bestimmte Zelltypen wie humane B-, T, und NK-Zellen oder murine lymphoide Zelllinien refraktär sind [31, 326, 356], obwohl NPC1 in allen Zellen gebildet wird [31, 67]. Kürzlich wurde in einer Studie gezeigt, dass der filovirale Replikationszyklus nicht nur vom Vorhandensein der notwendigen Wirtszellfaktoren, sondern auch von zellulären Restriktionsfaktoren beeinflusst wird [66]. Trotz relativ hoher NPC1-Rezeptor-Expressionslevel in humanen T-Zellen [65], kommt es so zu abortiven Infektionen [66].

In Abbildung 14 sind eine Stunde nach Infektion bei den verschiedenen Zellkulturen unterschiedliche Mengen viraler RNAs zu erkennen, obwohl alle Zellen nach der Infektion identisch gewaschen wurden. Dies könnte aufzeigen, dass EBOV an den unterschiedlichen Zelltypen unterschiedlich stark adhäriert, was ebenfalls einen gewissen Einfluss auf die Replikationskinetik haben könnte. Auch wenn eine Virusaufnahme in die Zellen stattfindet und eine Mindestmenge an NPC1-Rezeptor exprimiert wird, so dass die Viruspartikel auch in das Cytosol gelangen, könnten Unterschiede in der Effizienz der viralen Replikation, Transkription, Translation, Assemblierung und Freisetzung von

Nachkommenviren (Abbildung 2) zu unterschiedlichen Virusreplikationsraten führen. Da bei den getesteten Primärzellkulturen mit niedriger Passagenzahl teilweise ein Gemisch unterschiedlicher Zelltypen vorlag, könnte auch der Anteil der infizierten Zellen im Monolayer die Ergebnisse stark beeinflussen. So wären verschiedenste Szenarien denkbar, in denen beispielsweise nur wenige Zellen im Monolayer infiziert werden aber diese Zellen große Menge Virus freisetzen oder umgekehrt viele Zellen infiziert sind, in diesen Zellen aber nur eine mäßige Virusvermehrung stattfindet. Um den Einfluss des NPC1-Rezeptor-Expressionslevels auf die Virusreplikationsrate weitergehend zu untersuchen, wären NPC1-Knock-down- oder -Knock-out-Experimente mit einzelnen Zellkulturen hilfreich.

Ebenfalls unerwartet zeigten MoLi-Prim-Zellen keine signifikante Virusreplikation innerhalb der ersten 96 h nach Infektion mit EBOV und schienen refraktär zu sein, obwohl sie ein mittleres NPC1-Rezeptor-Expressionslevel auf dem Niveau von MoKi-Zellen aufweisen. Möglicherweise ist der *Entry*-Prozess in MoLi Prim-Zellen beeinträchtigt, weil die notwendigen Faktoren für das *Attachment* nicht oder nur in geringer Menge exprimiert werden. Bisher wurden erst wenige Zelltypen beschrieben, die refraktär gegenüber EBOV-Infektionen sind. Fast alle humanen Zelltypen und eine Vielzahl anderer Mammalia-Zellen sind suszeptibel gegenüber Infektionen mit Filoviren. Zu den wenigen bekannten Zelltypen, die refraktär sind, gehören neben den o.g. Zellen lymphoiden Ursprungs, Zellen mit D502F-Polymorphismus, Zellen von Patienten mit der Niemann-Pick-Krankheit und Zellen von Moskitos. Durch EBOV-GFP-Infektionen von MoLi Prim-Zellen konnte gezeigt werden, dass diese Zellen nicht refraktär sind, aber die Virusreplikation nur in sehr wenigen Zellen stattfindet (Abbildung 20). Wie auch bei MoLu Prim-Zellen waren selbst 8 Tage nach Infektion nur sehr wenige infizierte Zellen auszumachen. Aus infizierten Einzelzellen entwickelten sich durch Infektion von benachbarten Zellen Cluster. Da sich aus sieben infizierten MoLi Prim-Einzelzellen sieben Zellcluster entwickelten, schien keine effiziente Neuinfektion von nicht benachbarten Zellen aus dem Zellkulturüberstand stattzufinden. Scheinbar ist auch die Freisetzung von Nachkommenviren aus

MoLi Prim-Zellen in den Zellkulturüberstand beeinträchtigt, so dass keine signifikanten Virusreplikation im Überstand gemessen werden konnte. Die Infektion der Nachbarzellen scheint durch direkte Zell-zu-Zell-Transmission stattzufinden, was bisher für Filoviren noch nicht beschrieben wurde. Dabei gelangen die Viruskomponenten über interzelluläre Poren in die benachbarten Zielzellen, was beispielsweise für die Ausbreitung von Masernviren in humanen Atemwegs-Primärzellkulturen beobachtet wurde [357]. Bei EBOV-Infektionen des Menschen kommt es u.a. zu einer massiven Virusreplikation in der Leber, welche ebenfalls zu der komplexen Pathogenese und schweren Symptomatik bei der Ebolaviruserkrankung beiträgt. Die geringen Virusreplikationsraten in primären Leberzellen aber auch zahlreichen anderen Primärzellen von *M. condylurus* wie Nieren-, Milz-, Lungen- und Tracheazellen, könnten auf eine niedrige Virusreplikationsrate in den zugehörigen Organen schließen lassen. Eine Hypothese, warum Reservoirwirte häufig asymptomatische Infektionen aufweisen, ist ein abweichender viraler Organotropismus im natürlichen Reservoir [195].

5.3.2 Veränderungen der EBOV-Replikationsrate in immortalisierten Zellen

In einer Reihe von Studien wurde gezeigt, dass Filoviren in Zellkulturen von unterschiedlichsten Chiroptera-Spezies üblicherweise zu hohen Titern replizieren [323, 327]. Für die überwiegende Mehrzahl von Filovirus-Infektionsexperimenten in Zellkultur wurden immortalisierte Zelllinien eingesetzt. Bei immortalisierten Zellen kann es zu starken Veränderungen des genetischen Hintergrunds und sogar zu einer Dedifferenzierung, also einem Verlust der Zelltyp-spezifischen Eigenschaften kommen [266]. In einer der wenigen Studien, in denen Primärzellen von Chiroptera zum Einsatz kamen, wurde gezeigt, dass MLAV genau wie EBOV und MARV einen breiten Zelltropismus besitzt [7]. In einer anderen Studie replizierte EBOV in primären Nierenzellen der Fruchtfledermaus *Artibeus jamaicensis* auf einem geringfügig niedrigerem Niveau als in immortalisierten Zelllinien aus den Flughunden *Epomops buettikoferi*, *H. monstrosus*, *R. aegyptiacus* [323]. Nach aktuellem

Kenntnisstand wurden in dieser Doktorarbeit erstmals Veränderungen der NPC1-Rezeptor-Expressionslevel und EBOV-Replikationsraten in Primärzellen und immortalisierten Zellen aus derselben Chiropteraspezies untersucht.

In den SV40T-immortalisierten MoKi-Zellen wurden mittlere NPC1-Rezeptor-Expressionslevel detektiert und dennoch hohe Virusreplikationsraten beobachtet. Die korrespondierenden Primärzellen MoKi Prim, aus denen die MoKi-Zelllinie entwickelt wurde, zeigten demgegenüber niedrige NPC1-Rezeptor-Expressionslevel und Virusreplikationsraten. So änderte sich die x-fachen Vermehrung der ebolaviralen RNA zwischen den Zeitpunkten 24 h und 96 h nach Infektion von 29 x in MoKi Prim zu 674 x in den immortalisierten MoKi-Zellen (Tabelle 8). Die bereits beschriebenen, möglicherweise abweichenden Eigenschaften von immortalisierten Zellen und ihren korrespondierenden Primärzellen sind in diesem Fall besonders drastisch.

Die Suszeptibilität von immortalisierten Zellen lässt nicht notwendigerweise Rückschlüsse auf das Wirtsspektrum [329] oder den Organotropismus eines Virus zu. So repliziert EBOV in R06E, einer immortalisierten Fibroblastenzelllinie aus *R. aegyptiacus* sehr gut [328], wohingegen *in vivo* nach Inokulation keine signifikante Virusreplikation in diesen Flughunden zu beobachten ist [252, 253]. Die Ergebnisse zeigen erneut, dass die Verwendung von immortalisierten Zellen für die Untersuchung von Wirtsspektrum oder möglichem Organotropismus zu Fehlinterpretationen führen könnte und Primärzellen für diese Zwecke ein geeigneteres Modellsystem zu sein scheinen.

5.3.3 Virusreplikation ohne Zellzerstörung in Primärzellen von *M. condylurus*

In den humanen Vergleichszellen HEK293 und HeLa zeigte sich nach Infektion mit EBOV ein starker CPE und die Zellen verloren zwischen Tag 7 und 10 vollständig die Adhärenz. Bei Vero UNC-Zellen war ein starkes Anschwellen der Zellen zu beobachten, was zuvor als Zellveränderung bei der Nekrose von Vero-Zellen beschrieben wurde [358]. Bei der Primärzellkultur NyKi Prim aus der europäischen Fledermaus *N. noctula*, die unmöglich ein natürliches

Reservoir von EBOV sein kann, zeigte sich ebenfalls weitreichende Zellzerstörung und z.T. große Plaques im Zellrasen. Auch R06E-Zellen aus dem Flughund *R. aegyptiacus*, welcher bereits als Reservoir für EBOV ausgeschlossen wurde, zeigten nach Infektion einen starken CPE [328]. Plaques und Zellzerstörung waren bei unseren Zellkulturen von *M. condylurus* nur bei den spontan immortalisierten MoSp Prim Late- und bei MoBra Prim-Zellen zu beobachten, wobei bei letzteren auch 16 Tage nach Infektion noch 80 % des Zellrasens intakt war (Abbildung 16). Die übrigen sieben von acht infizierten Primärzellkulturen von *M. condylurus* zeigten keinen (MoTra Prim und MoKi Prim) oder nur geringen CPE, wobei in fünf Primärzellkulturen ein im Vergleich zu den nicht-infizierten Zellen verstärktes Zellwachstum (MoLu Prim, MoTes Prim, MoLi Prim, MoSp Prim Early und MoSk Prim) beobachtet wurde. Weitere hypothetisierte Charakteristika von Reservoirwirt-Virus-Beziehungen sind, dass das Virus zytopathisch im nicht-natürlichen Wirt aber nicht in seinem Reservoir ist [195]. Die Virusinfektion wird vom Reservoirwirt auch bei hohen Virustitern besser toleriert. „Toleranz“ bedeutet in diesem Zusammenhang, dass trotz Virusreplikation Gesundheit und Fitness erhalten bleiben [159, 160]. Beide Charakteristika scheinen nur auf Primärzellen von *M. condylurus* zuzutreffen: Zellschädigungen und -zerstörungen waren, außer für MoBra Prim in geringem Ausmaß, bei keiner anderen der infizierten Primärzellkulturen mikroskopisch zu beobachten. Trotz z.T. höherer RNA-Titer 96 h nach Infektion (MoSk Prim, MoTes Prim) (Abbildung 14), waren die Zellen vital und konnten z.T. mehrfach passagiert werden. MoLu Prim_EBOV-Zellen tolerierten selbst über 150 Tage nach initialer Infektion kontinuierlich EBOV in den Zellen (Abbildung 21) und im Überstand (Abbildung 15), ohne dass Zellschädigungen erkennbar waren. Nach aktuellem Kenntnisstand wurde die Toleranz von EBOV in Primärzellen von Chiroptera bisher nicht in der Literatur beschrieben. Niedrige Virusreplikationsraten und Toleranz in den zugehörigen Organen *in vivo* könnten den bei Reservoirwirten häufig beobachteten asymptomatischen Infektionen zu Grunde liegen.

5.3.4 Stark erhöhte NPC1-Rezeptor-Expressionslevel nach Infektion mit Filoviren

An Tag 22 nach Infektion mit EBOV und MARV konnten stark erhöhte NPC1-Rezeptor-Expressionslevel in allen untersuchten MoLu Prim-, MoBra Prim und MoKi-Zellen festgestellt werden (Abbildung 17). Keine Unterschiede machte es, wie hoch die Grundexpression in den jeweiligen Zellen vor Infektion war. EBOV und MARV scheinen im Infektionsverlauf die Expression ihres eigenen Hauptrezeptors NPC1 noch oben zu regulieren, was bisher nicht in der Literatur beschrieben wurde. Da nur ein kleiner Anteil der Zellen in MoLu Prim-Zellkulturen mit EBOV infiziert wird (Abbildung 20), der Effekt der erhöhten NPC1-Rezeptor-Expressionslevel jedoch in allen untersuchten Zellen erkennbar war, wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein löslicher Faktor von den infizierten Zellen in den Zellkulturüberstand abgegeben wurde und so die Veränderungen der Expressionslevel auch in nicht-infizierten Zellen hervorruft. Zur Überprüfung der Hypothese sollten in zukünftigen Experimenten weitere Anstrengungen unternommen werden, Cofärbungen von NPC1 und EBOV bzw. MARV zu realisieren. Um weiter zu untersuchen, ob ein löslicher Faktor für den beobachteten Effekt verantwortlich ist, könnte Zellkulturüberstand von infizierten Zellen inaktiviert und auf nicht-infizierte Zellen übertragen werden. Dadurch könnte gezeigt werden, dass eine lösliche Komponente im Überstand für die erhöhten NPC1-Rezeptor-Expressionslevel verantwortlich ist.

Möglicherweise führt die beobachtete Erhöhung der NPC1-Rezeptor-Expressionslevel auch dazu, dass der Virustiter im Zellkulturüberstand von MoLu Prim_EBOV-Zellen höher als in MoLu Prim-Zellen war (Abbildung 15). Im vorliegenden Experiment wurde allerdings nicht die zeitliche Komponente untersucht. Zukünftige Untersuchungen sollten daher außerdem der Frage nachgehen, wie schnell nach initialer Infektion diese Effekte zu beobachten sind. Der in 5.3.1 beschriebene potenzielle Zusammenhang zwischen NPC1-Rezeptor-Expressionslevel und Virusreplikationsrate könnte daher insbesondere zu Beginn der Infektion von Bedeutung sein. Später im Infektionsverlauf könnten sich die beschriebenen Effekte und Unterschiede

zwischen den Zellkulturen durch das Hochregulieren von NPC1 relativieren und andere Effekte dazu beitragen, wie effizient das Virus in den unterschiedlichen Zellen repliziert.

5.4 Toleranz und Persistenz von EBOV in Zellen von *M. condylurus*

Ungewöhnlich für RNA-Viren mit einer fehleranfälligen RNA-Polymerase, weist das Genom von EBOV seit der Entdeckung des Virus vor 44 Jahren eine bemerkenswerte Stabilität auf [359]. Dies impliziert, dass EBOV einen hohen Grad der Adaptation im Reservoirwirt erreicht zu haben scheint. Eine Hypothese ist, dass zusätzliche Wirtsfaktoren für die Limitierung der Pathogenität im Reservoir verantwortlich sein könnten [359]. Diese Faktoren würden dann die Balance zwischen Immunität und Virusreplikation ermöglichen, damit das Virus sich einerseits ausbreiten und andererseits im Reservoirwirt persistieren kann. Gerade in Fledermauskolonien mit hohen Populationsdichten sind persistente Virusinfektionen eine wichtige Strategie, um einen Verlust des Virus aus der Population durch zunehmende protektive Immunität zu verhindern [74].

Um die intrinsische Fähigkeit der Viruspersistenz in der potenziellen Reservoirspezies zu untersuchen, wurden Primärzellen von *M. condylurus* nach EBOV-Infektion einer Langzeitkultivierung unterzogen. Die Zellen tolerierten die EBOV-Infektion weit länger als alle getesteten humanen oder Affenkontrollzellen (Abschnitt 4.3.2). In Primärzellen aus Gehirn und Hoden, welche zu den immunprivilegierten Organen zählen, in denen das Virus beim Menschen zu persistieren vermag, konnte keine dauerhafte EBOV-Persistenz beobachtet werden. Allerdings können die Besonderheiten von immunprivilegierten Organen wie die physiologischen Barrieren (Blut-Hirn- und Blut-Hoden-Schranke) oder die Unterdrückung von proinflammatorischen Immunantworten nicht in Zellkultur simuliert werden, so dass die Bedeutung dieser Organe für die Viruspersistenz im Reservoirwirt schwer abzuschätzen ist. Demgegenüber wurden infizierte MoLu Prim-Zellen bis Tag 150 wöchentlich passagiert und erreichten stets 100%ige Konfluenz. Virus und Wirtszellen

schiene in einem Gleichgewicht zu sein, so dass Virusreplikation und hoher Virustiter dauerhaft toleriert wurden (Abbildung 15; Abbildung 19), ohne dass Zellwachstum und -viabilität beeinträchtigt oder Zellschädigungen erkennbar waren (Abbildung 21). Alle getesteten Primärzellen von *M. condylurus* wiesen Charakteristika auf, die eine gewisse Toleranz von EBOV und die Etablierung einer persistenten Infektion begünstigten. Aber nur in Lungenprimärzellen schien es zu einer dauerhaften Persistenz von EBOV gekommen zu sein.

Obwohl bereits an Tag 22 nach initialer Infektion stark erhöhte NPC1-Rezeptor-Expressionslevel in MoLu Prim-Zellen festgestellt wurden (Abbildung 17), schien dies nicht zur Infektion der Mehrzahl der Zellen im Monolayer zu führen (Abbildung 20; Abbildung 21; Anhang, Abbildung 16). Durch Infektionen mit EBOV-GFP konnte beobachtet werden, dass sich aus wenigen infizierten Einzelzellen Cluster von infizierten Zellen entwickelten. Wie auch für MoLi Prim-Zellen beobachtet, scheint überwiegend eine Infektion von Nachbarzellen im Monolayer durch direkte Zell-zu-Zell-Transmission zu erfolgen. Obwohl relativ viel infektiöses Virus in den Zellkulturüberstand gelangt, scheint keine effiziente Neuinfektion von nicht benachbarten Zellen stattzufinden. Möglicherweise sind bestimmte am *Entry*-Prozess beteiligte Faktoren nicht oder nur wenig vorhanden, so dass nur wenige Zellen im Monolayer infiziert werden. Die übrigen Schritte des filoviralen Replikationszyklus scheinen nach erfolgreichem Eintritt in die Wirtszelle vollumfänglich abzulaufen. Ein relativ hoher Virustiter von 6×10^5 TCID₅₀/ml an Tag 150 nach initialer Infektion im Zellkulturüberstand, scheint für eine starke Virusreplikation in den wenigen infizierten Zellen im Monolayer zu sprechen, wozu die erhöhten NPC1-Rezeptor-Expressionslevel beitragen könnten.

Ein hoher Virustiter lässt nicht direkt Rückschlüsse auf die Permissivität einer Zellkultur zu: Obwohl für MoLu Prim_EBOV relativ hohe Virustiter im Zellkulturüberstand gemessen wurden, waren die meisten Zellen im Monolayer nur wenig permissiv. Starke Virusreplikation führt häufig zu einer direkten Zellzerstörung, weshalb für die Etablierung von persistenten Infektionen die Virusreplikation zumindest in einigen Zellen heruntergefahren werden muss [74]. Auch die langsame Ausbreitung von Zelle zu Zelle wird als möglicher

Persistenzmechanismus beschrieben [74]. Der genaue Mechanismus der Viruspersistenz *in vitro* und *in vivo* kann auf Basis der Daten nicht abgeleitet werden. Ein möglicher Schlüssel zur Toleranz und Persistenz von EBOV *in vivo* könnte darin liegen, dass zumindest zeitweise eine effektive Virusreplikation möglich ist, aber ein Großteil der Zellen im Organ, wie auch in der Zellkultur *in vitro*, uninfiziert bleiben und das Virus sich nur sehr langsam von Zelle zu Zelle ausbreitet. Die uninfizierten Zellen erfüllen weiter ihre spezifischen Funktionen, was zu einer möglichen asymptomatischen Infektion im Reservoirwirt beitragen könnte. Welche Mechanismen *in vivo* eine Rolle spielen, damit das Virus toleriert und nicht durch Antikörper- und T-Zell-Antworten eliminiert wird, könnte in Zukunft mit experimentellen Infektionen von *M. condylurus* untersucht werden.

Bei der Persistenz von EBOV in MoLu Prim-Zellen scheint es sich nicht um ein zufälliges Ereignis zu handeln, da auch EBOV-GFP in einem unabhängigen Experiment eine dauerhaft persistierende Infektion in diesen Zellen entwickelte. Die verstärkte Bildung von DI-Partikeln kann durch Konkurrenz um zelluläre und virale Genprodukte zum Dämpfen der Virusreplikation und so auch zur Etablierung von persistierenden Infektionen beitragen [75, 96-100]. So wurden in einer Studie infolge von zehn Passagen von unverdünntem EBOV mit hoher MOI (> 1) DI-Partikel generiert, die eine persistente Infektion von Vero-Zellen ermöglichten [101]. MoLu Prim-Zellen wurden hingegen mit niedriger Virusmenge infiziert und die Menge an infektiösem Virus nahm sogar über die Zeit zu (Abbildung 15). Die Etablierung der Persistenz in Lungenprimärzellen von *M. condylurus* wurde nicht durch eine Erhöhung des Anteils an DI-Partikeln erzwungen (Abbildung 15), sondern scheint durch die spezifischen Charakteristika der Zellen ermöglicht zu werden. Auch die beschriebene Selektion von Virusvarianten aus der Quasispezies mit reduzierter Cytopathogenität als Persistenzmechanismus [74, 75, 92-95], scheint hier keine Rolle zu spielen, da MoLu Prim-Zellen in verschiedenen Experimenten direkt nach Infektion EBOV tolerierten. Nach Übertragung des Überstandes von MoLu Prim_EBOV (150 Tage nach initialer Infektion) auf MoKi-Zellen waren keine Unterschiede zum ursprünglichen EBOV-Virusstock erkennbar. Es

könnten abschließend Sequenzanalysen des Virus im Überstand von persistent infizierten MoLu-Prim_EBOV-Zellen und ein Vergleich der Cytopathogenität auf Vero-Zellen durchgeführt werden, um mögliche Selektionsprozesse zu untersuchen.

Nach einer akuten Infektion kann das Respiratorische Syncytial-Virus (RSV) über Monate in den Lungen und Atemwegen von Menschen persistieren, wobei die Mechanismen der Persistenz im Detail noch nicht verstanden sind [102]. Die RNA von neu beschriebenen Filoviren in China wurde überwiegend aus den Lungen von Flughunden der Gattung *Rousettus* und *Eonycteris* isoliert [360, 361]. Dass BOMV-RNA wiederholt in Lungen von *M. condylurus* detektiert wurde [263, 264] und EBOV wiederholt persistierende Infektionen in Lungenprimärzellen etablierte, könnte einen Hinweis darauf darstellen, dass Ebolaviren tatsächlich in den Lungen dieser Fledermausart persistieren können. Der Nachweis von EBOV in den Lungen von *M. condylurus* nach experimenteller Infektion [191] impliziert, dass es in den beengten Verhältnissen der Fledermausquartiere auch zu einer respiratorischen Ausbreitung des Virus kommen könnte.

Der Nachweis der EBOV-Persistenz in Primärzellen von *M. condylurus* könnte die intrinsische Fähigkeit widerspiegeln, dass Ebolaviren auch *in vivo* in dieser Fledermausart und in der Population persistieren können, was das essentielle Kriterium bei der Identifizierung eines natürlichen Reservoirs darstellt [183, 197]. Die Schwierigkeit infektiöses Nipahvirus aus gefangenen oder experimentell infizierten Flughunden zu isolieren, könnte darin begründet liegen, dass das Virus an unbekannten Orten im Tier persistiert und die Virusausscheidung nur zeitweilig erfolgt [362]. Auch für MARV wird eine Viruspersistenz in bestimmten Organen von *R. aegyptiacus* angenommen [199, 200]. Eine mögliche Persistenz von Ebolaviren in den Lungen von *M. condylurus*, mit Phasen ohne Virusausscheidung, könnte mit dafür mitverantwortlich sein, dass bisher noch kein infektiöses Virus in diesen Fledermäusen nachgewiesen wurde, *Spillover*-Ereignisse auf den Menschen sporadisch und selten auftreten und das natürliche Reservoir noch nicht eindeutig identifiziert werden konnte.

5.5 Einfluss hoher und niedriger Temperaturen auf Wirtszellen und Virusreplikation

5.5.1 Temperaturtoleranz von *M. condylurus*-Zellen

Die in Abschnitt 1.3.3 beschriebene besondere Thermoregulation von *M. condylurus* führt zu einer hohen Toleranz dieser Fledermausspezies gegenüber hohen und niedrigen Temperaturen. Diese Temperaturtoleranz konnte auch auf Zellkulturebene bestätigt werden. Ausschließlich Zellen von *M. condylurus* tolerierten alle getesteten Wachstumstemperaturen von 27°C bis 42°C, verloren nicht die Adhärenz und zeigten hohe Viabilitätswerte, während sich die humanen und Affenzellen größtenteils von der Zellkulturoberfläche ablösten. Die Zellzahl- und Viabilitätsbestimmung von HEK293-Zellen in Suspension zeigte zwar, dass die Zellen am Ende der Messung noch vital waren und sich vermehrten. Allerdings wird bei vielen adhärennten Zellen, wie auch bei HEK293-Zellen, bei einer Ablösung von der Oberfläche und Verlust der Zell-Matrix-Interaktion die Apoptose ausgelöst, was auch als Anoikis bezeichnet wird [363-366]. Daher kann ein zeitnahes Absterben der HEK293-Zellen in Suspension angenommen werden. Vero UNC-Zellen blieben zwar bei 27°C adhärennt, jedoch entwickelten sich vielkernige Syncytien, so dass nicht von einer Temperaturtoleranz dieser Zellen ausgegangen werden kann. Alle getesteten Primärzellkulturen von *M. condylurus* zeigten demgegenüber bei 27°C keinerlei morphologische Veränderungen; bei höheren Wachstumstemperaturen von 42°C waren Zellvergrößerungen erkennbar. Dennoch blieben die Zellen adhärennt und vital.

Die Temperaturschwankungen treten *in vivo* während des Torpors oder in Hitzeperioden eher über den Zeitraum von einigen Stunden auf. Es gibt nur wenige Studien, bei denen Chiroptera-Zellen bei höheren Temperaturen als 37°C untersucht wurden. Bei der Zelllinie HypNi/1.1 aus dem Flughund *H. monstrosus* sinkt der Anteil an lebenden Zellen nach 72 h in Kultur bei 41°C auf unter 20 %, während die Zelllinie REO5 aus *R. aegyptiacus* diese Temperatur auch über 96 h gut toleriert [323]. Untersuchungen des Einflusses niedriger Inkubationstemperaturen auf Chiroptera-Zellen und

EBOV-Replikationskinetik wurden bisher nicht beschrieben. In den Zellkulturexperimenten im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass die ausgesprochene Toleranz gegenüber Temperaturschwankungen *in vivo* auch auf Zellkulturen von *M. condylurus* zutrifft und selbst viele Tage bei höheren oder niedrigen Inkubationstemperaturen toleriert werden. MoLu Prim- und MoBra Prim-Zellen tolerierten 21 Tage Inkubation bei 27°C (Abbildung 26) oder 42°C (Anhang, Abbildung 21) ohne Verlust der Adhärenz und konnten im Anschluss weiter passagiert werden.

In einer für 147 Tage an 27°C adaptierten MoKi-Zellkultur (MoKi_LT) wurde der Einfluss einer niedrigen Temperatur auf das NPC1-Rezeptor-Expressionslevel untersucht. Bei niedrigeren Temperaturen wird die Menge an Cholesterol in der Plasmamembran bei vielen Tieren gesenkt [367], um eine ausreichende Fluidität für die Zellfunktionen zu gewährleisten [368, 369]. Der intrazelluläre Transport von Cholesterol zwischen Plasmamembran, Endoplasmatischem Retikulum (ER), Golgi Apparat und anderen Organellen ist komplex und erfolgt über carriervermittelte Diffusion, Transportvesikel oder direkten Membrankontakt [352]. Cholesterol aus der Plasmamembran kann internalisiert und durch Endocytose in Endosomen gelangen [370]. Der Efflux von Cholesterol aus den späten Endosomen und Lysosomen, an dem NPC1 beteiligt ist, kann zum ER oder zur Plasmamembran erfolgen [353]. Das erhöhte NPC1-Rezeptor-Expressionslevel insbesondere in Zellkernnähe in MoKi_LT-Zellen (Abbildung 24) könnte auf verstärkten Cholesteroltransport zurück zum ER über den endo-lysosomalen Weg bei niedrigen Temperaturen hinweisen. Die Zellen zeigten im Vergleich zu MoKi-Zellen 96 h nach Infektion mit EBOV leicht erhöhte Virusreplikationsraten (Anhang, Abbildung 20). Da die Virusreplikation bei 27°C generell auf niedrigem Niveau erfolgte, war vermutlich die detektierbare Steigerung der Virusreplikationsrate kleiner als erwartet. Wie zeitnah veränderte NPC1-Rezeptor-Expressionslevel in Adaptation an veränderte Temperaturen auftreten und möglicherweise auch die Virusreplikation beeinflussen, wäre ein interessanter Aspekt zukünftiger Untersuchungen.

5.5.2 Replikation von EBOV bei 42°C

HEK293-Zellen zeigten bei 42°C eine signifikant geringere EBOV-Replikationsrate als bei 37°C, während bei allen getesteten Zellen von *M. condylurus* nur ein geringer oder, im Falle von MoLu Prim-Zellen, kein Abfall der Replikationsrate zu beobachten war (Abbildung 25). Vergleichbare Beobachtungen konnten bei den Chiroptera-Zelllinien RE06 aus *R. aegyptiacus* und HypNi/1.1 aus *H. monstrosus* gemacht werden: Nach Infektion mit EBOV und Inkubation bei 37°C oder 41°C waren nur geringe Unterschiede in der Virusreplikationsrate zu beobachten [323]. In einer weiteren Studie mit dem Humanen Adenovirus Serotyp 5 konnte nach Infektion von verschiedensten humanen Zellkulturen bereits bei einer erhöhten Temperatur von 39,5°C eine deutlich reduzierte Virusreplikation gezeigt werden [371]. Die unterschiedliche Toleranz der humanen Zelllinie und der Zellkulturen von *M. condylurus* gegenüber erhöhten Temperaturen liefert eine Erklärung für diese Beobachtungen. Denn nach 96 h war bereits ein beträchtlicher Anteil der HEK293-Zellen nicht mehr adhärent und es ist zu vermuten, dass die für die Virusreplikation notwendigen zellulären Komponenten nur noch bedingt zur Verfügung standen.

Darüber hinaus ist jedoch auch die Toleranz von EBOV gegenüber höheren Temperaturen auffällig. Für aviäre Influenzaviren, welche als Geflügelviren sogar an höhere Körpertemperaturen adaptiert sind, konnten bereits bei Temperaturen oberhalb von 38°C Hitzeinaktivierungen der viralen RNA-Polymerase festgestellt werden [372]. Die RNA-Polymerase von EBOV und die anderen Komponenten des Virus scheinen dahingegen ebenfalls erhöhte Temperaturen zu tolerieren. Demgegenüber replizierte MARV bei 42°C signifikant schlechter in MoKi-Zellen als EBOV, so dass eine geringere Toleranz von MARV gegenüber höheren Temperaturen in MoKi-Zellen angenommen werden kann.

Wenn *M. condylurus* ein natürliches Reservoir von EBOV darstellen sollte, wäre das Virus in dieser Fledermaus in den z.T. sehr heißen Quartieren und während des Fluges immer wieder hohen Körpertemperaturen ausgesetzt. Da Reservoirwirt und Virus koevolvieren, könnte die Toleranz gegenüber höheren

Temperaturen bei allen untersuchten Zellkulturen von *M. condylurus* und die Temperaturtoleranz von EBOV, aber nicht von MARV, einen weiteren Hinweis für das natürliche Reservoir darstellen.

5.5.3 Replikation von EBOV bei 27°C

Die Bedeutung von Torpor für die Infektionsdynamik von Pathogenen ist bisher weitestgehend unbekannt [373]. Bei niedrigen Körpertemperaturen während des Torpors oder der Hibernation wurden in Chiroptera niedrige Virusreplikationsraten beim Japanischen-Enzephalitis-Virus (JEV) und Rabiesvirus (RABV) detektiert [174, 374, 375]. Bei aviären Influenzaviren konnte bei Temperaturen unterhalb von 34°C eine signifikante Hemmung der Virusvermehrung in Hühnerfibroblasten festgestellt werden [372]. Der Einfluss von niedrigen Temperaturen auf die Virusreplikation von Filoviren wurde bisher nicht beschrieben. Sowohl für EBOV als auch für MARV war für alle untersuchten Zellkulturen bei 27°C eine deutlich geringere Replikationsrate als bei 37°C zu beobachten (Abbildung 25). Für Fledermäuse der Art *M. condylurus* werden tägliche Phasen von Torpor beschrieben, in denen sich die Körpertemperatur entsprechend der Umgebungstemperatur verändert [172]. Die untersuchte potenzielle Körpertemperatur von 27°C wäre bei einer Umgebungstemperatur zwischen 20-25°C zu erwarten (Abbildung 5). Sollte es sich bei *M. condylurus* tatsächlich um ein Reservoir von Ebolaviren handeln, würde bei einer Körpertemperatur von 27°C oder niedriger die Virusreplikation in den Tieren voraussichtlich nur noch stark reduziert ablaufen.

Der Q_{10} -Wert ist ein Temperaturfaktor, der die Änderung der Stoffwechselrate bei einer Temperaturerhöhung um 10°C beschreibt. Die Stoffwechselraten der meisten Tiere mit veränderlicher Körpertemperatur nehmen bei jeder Erhöhung der Umgebungstemperatur um 10°C um das 2 bis 3-fache zu [376]. Die Absenkung der Körpertemperatur um 10°C von 37°C auf 27°C führt voraussichtlich zu deutlich reduzierten Stoffwechselraten in *M. condylurus*, was darüber hinaus auch einen großen Einfluss auf die Funktion des Immunsystems haben könnte [377]. Niedrigere Körpertemperaturen und Stoffwechselraten

könnten Immunantworten unterdrücken, so dass die Viruseliminierung aus Chiroptera verzögert wird [147, 156].

5.5.4 Wechselnde Körpertemperatur als potenzieller Schlüsselfaktor für Toleranz gegenüber Ebolaviren

Für die beiden Fledermausarten *Tadarida brasiliensis* und *Myotis lucifugus* war nach Inokulation von Rabiesvirus (RABV) bei niedrigen Temperaturen zunächst wenig oder keine Virusreplikation detektierbar. Bei einem Transfer der Tiere zu wärmeren Temperaturen, begann das Virus erneut stärker zu replizieren [375]. Um zu untersuchen, ob EBOV längere Zeit bei niedrigen Temperaturen überdauern kann und ob temperaturabhängige Reaktivierungen mit hohen Virusreplikationsraten zu beobachten sind, wurden von uns Versuche mit wechselnden Inkubationstemperaturen durchgeführt. Bei einem Temperaturwechsel von 27°C auf 37°C an Tag 7 nach Infektion konnte bei allen untersuchten Zellkulturen von *M. condylurus* eine temperaturabhängige Reaktivierung mit deutlicher Erhöhung der Virusreplikationsrate beobachtet werden (Abbildung 26; Tabelle 9). Die besondere biologische Eigenschaft der Heterothermie mit schwankenden Körpertemperaturen bei *M. condylurus* könnte dazu führen, dass die Virusreplikationsfähigkeit temporär stark eingeschränkt wird. Niedrige Virusreplikationsraten während des Torpors könnten einen Mechanismus darstellen, wie Infektionserreger in ihrem Wirt „überwintern“ [373]. Da bei *M. condylurus* sogar Körpertemperaturen von 12°C gemessen werden konnten [172], ist davon auszugehen, dass zu bestimmten Jahreszeiten während des Torpors kaum noch Virusreplikation stattfinden kann. Demgegenüber, obwohl *in vitro* nicht zu beobachten, könnten *in vivo* die fieberähnlichen Temperaturen im Flug und in den heißen Fledermausquartieren [175] durch Steigerung der Stoffwechselraten und Aktivierung verschiedener Komponenten des Immunsystems [176] ebenfalls zur Kontrolle der Virusvermehrung beitragen. So könnte die wechselnde Körpertemperatur einen möglichen Schlüsselfaktor für die Toleranz von *M. condylurus* gegenüber Ebolaviren darstellen und auch bei der Etablierung der Viruspersistenz in den Tieren eine Rolle spielen, indem *in vivo* eine überschießende Virusreplikation

verhindert und so die Balance zwischen Virusvermehrung und Fitness des Reservoirwirtes gewährleistet wird.

EBOV-infizierte Zellkulturen von *M. condylurus* waren selbst nach fünfmaligem Wechsel der Inkubationstemperatur vital und konnten im Anschluss weiter passagiert werden (Anhang, Abbildung 22). Die humanen Vergleichszellen (HEK293) lösten sich beim Temperaturwechsel vollständig von der Zellkulturoberfläche ab. Aber auch MARV-infizierte Zellkulturen von *M. condylurus* tolerierten Temperaturwechsel schlechter als EBOV-infizierte Zellen und verloren die Adhärenz. Im Gegensatz zur EBOV-Infektion scheint die MARV-Infektion die Zellen zu beeinträchtigen, was einen weiteren Hinweis dafür darstellen könnte, dass EBOV, aber nicht MARV, und Zellen des möglichen Reservoirwirtes *M. condylurus* aneinander adaptiert zu sein scheinen.

5.6 Relevanz der Ergebnisse

Das Vorkommen von *M. condylurus* in Subsahara-Afrika überlappt mit den meisten Gebieten, in denen bisher Ebola-Ausbrüchen stattfanden: Sowohl in Guinea, Sierra Leone und Liberia [140, 250], wo es zum bisher größten Ebola-Ausbruch gekommen ist, als auch in den Provinzen Nord-Kivu, Ituri und Sud-Kivu im Osten der Demokratischen Republik Kongo [378], wo es zum bisher zweitgrößten Ebola-Ausbruch gekommen ist, wird das Vorkommen von *M. condylurus* beschrieben. Die instabile politische Situation und dadurch möglicherweise eingeschränkte zoologische Forschung und Speziesdokumentation in einigen Ländern Zentralafrikas wie in der Demokratischen Republik Kongo oder Gabun, könnte dazu beitragen, dass *M. condylurus* bisher noch nicht in allen Ebola-Ausbruchsgebieten beschrieben wurde. Auch für das im Rahmen dieser Doktorarbeit ausgewählte Fanggebiet im Süden der Elfenbeinküste war das Vorkommen von *M. condylurus* zuvor nicht beschrieben (Abbildung 4). Darüberhinaus besteht theoretisch die Möglichkeit, dass eine nah verwandte, insektivore Fledermausspezies in den Gebieten, in denen *M. condylurus* nicht vorkommt, als Reservoirspezies fungiert.

Das dicht gedrängte Zusammenleben von teilweise tausenden Tieren in den Fledermausquartieren liefert optimale Bedingungen für Virustransmission und -zirkulation [147]. Das Vorkommen in anthropogenen Strukturen wie Hausdächern könnte enge Kontakte mit Menschen und mögliche *Spillover*-Ereignissen beeinflussen. Der Nachweis von EBOV-spezifischen Antikörpern [255], Virusreplikation ohne Krankheitssymptome nach experimenteller Infektion [191] und epidemiologische Anhaltspunkte [250] stellten erste Hinweise dar, dass diese Fledermausspezies ein potenzielles Reservoir für Ebolaviren darstellen könnte. Nach Beginn dieser Doktorarbeit wurde desweiteren BOMV entdeckt und *M. condylurus* als Wirt identifiziert. Unklar ist weiterhin, ob *M. condylurus* auch das natürliche Reservoir für BOMV und andere Ebolaviren darstellt. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden weitere

molekulare und zellbiologische Hinweise gewonnen, die *M. condylurus* als natürliches Reservoir für Ebolaviren wahrscheinlicher erscheinen lassen.

So wiesen die allermeisten Primärzellkulturen von *M. condylurus* deutlich geringere NPC1-Rezeptor-Expressionslevel als verschiedenste Kontrollzellen auf, was das Ergebnis eines gegenseitigen Adaptationsprozesses von Ebolaviren und *M. condylurus* darstellen könnte. Nach Infektion zeigten sich in zahlreichen Primärzellen von Niere, Milz, Lunge und Trachea niedrigere Virusreplikationsraten, die mit den niedrigen NPC1-Rezeptor-Expressionsleveln korrelierten. Möglicherweise führt dies auch *in vivo* zu einer Virusreplikation auf niedrigerem Niveau in den zugehörigen Organen und einem abweichenden viralen Organotropismus im natürlichen Reservoir. Alle getesteten Primärzellen von *M. condylurus* zeigten darüber hinaus eine hohe Toleranz gegenüber EBOV im Vergleich zu Kontrollzellen, und die dauerhafte Persistenz in Lungenprimärzellen könnte die intrinsische Fähigkeit widerspiegeln, dass Ebolaviren auch *in vivo* in dieser Fledermausart persistieren. Die wiederholte Detektion von BOMV-RNA in Lungen von *M. condylurus* [263, 264] und die dauerhafte Persistenz in Lungenprimärzellen, könnten auf die zentrale Bedeutung dieses Organs im natürlichen Reservoir als Persistenzort hinweisen, so dass auch eine mögliche respiratorische Ausbreitung in der dicht gedrängten Reservoirpopulation nicht ausgeschlossen ist. Dass ein Großteil der Lungenprimärzellen im Monolayer uninfiziert bleiben und sich EBOV nur sehr langsam von Zelle zu Zelle ausbreitet, könnte einen Mechanismus aufzeigen, wie es *in vivo* zur Toleranz und zu asymptomatischen Infektionen kommen könnte. Die schwankenden Körpertemperaturen bei *M. condylurus* könnten einen weiteren Schlüsselfaktor für die Toleranz von Ebolaviren *in vivo* darstellen und darüber hinaus an der Balance zwischen Viruskontrolle und Virusvermehrung beteiligt sein.

Mutmaßliche Eigenschaften eines Filovirus-Reservoirs werden wie folgt beschrieben: Es handelt sich um ein Säugetier von kleiner Körpergröße, dessen Verbreitung mit der des Virus übereinstimmt und welches persistierende, weitestgehend asymptomatische Infektionen unterstützt [379]. Das Virus ist cytopathisch im nicht-natürlichen Wirt, aber nicht im Reservoir, und die Infektion

wird vom Reservoirwirt auch bei hohen Virustitern besser toleriert [195]. *M. condylurus* ist ein Säugetier von kleiner Körpergröße, dessen Verbreitung mit der des Virus zu großen Teilen übereinstimmt. In Primärzellen der Fledermaus waren nach Infektion mit EBOV keine Zellschädigungen erkennbar und die *In-vitro*-Versuche lieferten Hinweise für Toleranz und asymptomatische Infektionen *in vivo*. Das essentielle Kriterium bei der Identifizierung eines natürlichen Reservoirs stellt der Nachweis der Viruspersistenz dar [183, 197], was *in vitro* wiederholt gezeigt werden konnte.

5.7 Ausblick

Während für Hendra- und Nipahviren verschiedene Vertreter der Flughundgattung *Pteropus* als natürliche Reservoir identifiziert werden konnten [149, 215, 216], stellt *R. aegyptiacus* nicht nur das natürliche Reservoir für MARV, sondern auch für das Sosuga virus (SosV) [380, 381] und möglicherweise auch für das Kasokero virus (KASV) dar. [382, 383]. Fraglich ist daher, ob *M. condylurus* das natürliche Reservoir für mehrere Ebolaviren wie EBOV, BOMV und TAFV sein kann. In einem ersten Schritt könnten dafür vergleichbare Infektionsexperimente mit Primärzellkulturen und den anderen Ebolaviren durchgeführt werden. Darüber hinaus ist unklar, ob ein Individuum möglicherweise auch mit verschiedenen Ebolaviren gleichzeitig infiziert sein kann. Um zunächst *in vitro* zu untersuchen, ob ein Ebolavirus die Superinfektion mit einem anderen Ebolavirus restringiert, könnte beispielsweise eine Superinfektion von MoLu Prim_EBOV mit TAFV durchgeführt werden. Zur weiteren Untersuchung möglicher Koinfektionen sollte auch eine genauere Charakterisierung der detektierten Viren aus der Metagenomstudie in *M. condylurus* erfolgen, für die diese Fledermausart ebenfalls ein natürliches Reservoir darstellen könnte.

Eine Hypothese zu den Eigenschaften von Reservoirwirten ist, dass durch bestimmte physiologische und ökologische Faktoren eine verstärkte Virusreplikation und -ausscheidung in persistent infizierten Chiroptera ausgelöst wird [201, 202]. Durch Stimulation mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)

wurden Reaktivierungen von persistent infizierten Zellkulturen mit verstärkter Virusreplikation beobachtet [384]. Inwieweit die Persistenz in Lungenzellen von *M. condylurus* von PMA beeinflusst wird und welche molekularen Mechanismen der Toleranz und Persistenz dieser Zellen zugrunde liegen, könnte in zukünftigen Projekten erforscht werden.

Eine weitere Hypothese zu den Eigenschaften von Reservoirwirten lautet, dass die Immunantworten die Virusreplikation effektiver kontrollieren [195]. In einem ersten Schritt wäre es daher interessant, die IFN-Antworten bei EBOV-Infektion in Primärzellen von *M. condylurus* zu studieren und mit humanen Zellen zu vergleichen. Das komplexe Zusammenspiel mit allen Komponenten des Immunsystems im Infektionsverlauf kann jedoch kaum *in vitro* simuliert werden. Für die endgültige Identifizierung des natürlichen Reservoirs sollten weitere Studien forciert werden, EBOV und andere Ebolaviren in *M. condylurus* zu detektieren und zu isolieren. Um die Rolle dieser Fledermausart für die Ökologie von Ebolaviren zu beurteilen und Fragen des Gewebetropismus, der Virustransmission oder der Immunantworten im Detail zu verstehen, könnten experimentelle Infektionen wertvolle Einblicke liefern.

6 Verzeichnisse

6.1 Abkürzungsverzeichnis

BMDM	<i>Bone marrow-derived macrophage (Makrophage aus Knochenmark)</i>
bp	<i>Basenpaare</i>
cDNA	<i>Complementary (komplementäre) DNA</i>
Contig	<i>Contiguous sequence (überlappende Sequenz)</i>
CoV	<i>Coronavirus</i>
COVID-19	<i>Coronavirus disease 2019</i>
CPE	<i>Cytopathischer Effekt</i>
DAPI	<i>4',6-Diamidin-2-phenylindol</i>
DCs	<i>Dendritic cells (Dendritische Zellen)</i>
ddH ₂ O	<i>Doppelt destilliertes Wasser</i>
DI-Partikel	<i>Defekte interferierende Partikel</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
ds	<i>Double-stranded (doppelsträngig)</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraacetat</i>
ER	<i>Endoplasmatisches Retikulum</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum (fetales Rinderserum)</i>
FW	<i>Forward (vorwärts)</i>
GFP	<i>Grün fluoreszierendes Protein</i>
IFN	<i>Interferon</i>
MERS	<i>Middle East Respiratory Syndrome</i>
MFI	<i>Mean Fluorescence Intensity</i>
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
MoKi_LT	<i>MoKi Low Temperature (MoKi-Zellen nach 147 Tagen bei 27°C)</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NHPs	<i>Non-human primates (nichtmenschliche Primaten)</i>
NPC1	<i>Niemann-Pick C1</i>
NTD	<i>N-Terminale Domäne</i>
PBS	<i>Phosphatgepufferte Salzlösung</i>

PBST	0,1 % Tween® 20 in PBS
PCR.....	<i>Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)</i>
PFA	<i>Paraformaldehyd</i>
PMA	<i>Phorbol-12-myristat-13-acetat</i>
rpm	<i>Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)</i>
RT-qPCR.....	<i>Reverse Transkriptase quantitative Polymerase-Kettenreaktion</i>
RV	<i>Reverse (rückwärts)</i>
SARS	<i>Schweres Akutes Respiratorisches Syndrom</i>
SOP	<i>Standard Operating Procedure</i>
ss.....	<i>Single-stranded (einzelsträngig)</i>
TAE	<i>TRIS-Acetat-EDTA</i>
TCID50	<i>Tissue Culture Infectious Dose 50</i>
TIM-1	<i>T-cell immunoglobulin and mucin domain 1</i>

6.2 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: AUFBAU EINES EBOLA-VIRUS-PARTIKELS.....	1
ABBILDUNG 2: EBOLAVIRALER REPLIKATIONSZYKLUS IN ANLEHNUNG AN [59]	6
ABBILDUNG 3: PHYLOGENIE EINIGER AFRIKANISCHER CHIROPTERA MIT <i>M. CONDYLURUS</i> IN ANLEHNUNG AN [139].....	11
ABBILDUNG 4: VORKOMMEN VON <i>M. CONDYLURUS</i> [140] UND AUSBRÜCHE DER EBOLAVIRUSERKRANKUNG IN ANLEHNUNG AN [14]	12
ABBILDUNG 5: KÖRPERTEMPERATUREN VON <i>M. CONDYLURUS</i> BEI UMGEBUNGSTEMPERATUREN ZWISCHEN 15°C BIS 45°C IN ANLEHNUNG AN [173].....	15
ABBILDUNG 6: KLIMADIAGRAMM ELFENBEINKÜSTE (ABIDJAN) – JAHRESÜBERSICHT [177]	17
ABBILDUNG 7: FÜTTERUNG, WIEGEN, MARKIERUNG UND BEPROBUNG VON FLEDERMÄUSEN AN DER ELFENBEINKÜSTE	33
ABBILDUNG 8: DETEKTIERTE VIRUSFAMILIEN IN ORALABSTRICHPROBEN AUS FLEDERMAUS-LANGZEITHALTUNG.....	56
ABBILDUNG 9: DETEKTIERTE VIRUSFAMILIEN IN URINPROBEN AUS FLEDERMAUS-LANGZEITHALTUNG.....	57
ABBILDUNG 10: PHASENKONTRASTMIKROSKOPIE AUSGEWÄHLTER PRIMÄRZELLKULTUREN VON <i>M. CONDYLURUS</i>	61
ABBILDUNG 11: VERGLEICH DER NPC1-REZEPTOR-EXPRESSIONSLEVEL IN VERSCHIEDENEN FLEDERMAUS-ZELLKULTUREN MIT KONFOKALER MIKROSKOPIE ...	66
ABBILDUNG 12: VERGLEICH DER NPC1-REZEPTOR-EXPRESSIONSLEVEL ZWISCHEN ZWEI FLEDERMAUS-ZELLKULTUREN UND ZWEI HUMANEN ZELLINIEN.....	67
ABBILDUNG 13: PROZENTSATZ AN NPC1-REZEPTOR-EXPRESSION IM VERGLEICH ZUR MOKI-ZELLINIE BESTIMMT DURCH DURCHFLUSSZYTOMETRIE	69
ABBILDUNG 14: EBOV-REPLIKATIONSKINETIK IN VERSCHIEDENEN ZELLKULTUREN ...	72
ABBILDUNG 15: VERGLEICH VON EBOV RNA UND VIRUSTITER IN AUSGEWÄHLTEN ZELLKULTURÜBERSTÄNDEN	74
ABBILDUNG 16: CYTOPATHISCHER EFFEKT BEI EBOV-INFIZIERTEN ZELLKULTUREN.....	75
ABBILDUNG 17: NPC1-REZEPTOR-EXPRESSIONSLEVEL IN <i>M. CONDYLURUS</i> - ZELLEN NACH INFektion MIT EBOV UND MARV	77
ABBILDUNG 18: LANGZEITKULTIVIERUNG VON EBOV-INFIZIERTEN PRIMÄRZELLEN VON <i>M. CONDYLURUS</i>	79

ABBILDUNG 19: EBOV-REPLIKATIONSKINETIK IN LANGZEITINFIZIERTEN <i>M. CONDYLURUS</i> -ZELLEN	80
ABBILDUNG 20: EBOV-GFP-INFEKTION VON ZELLKULTUREN	81
ABBILDUNG 21: PERSISTIEREND INFIZIERTE MOLU PRIM_EBOV-ZELLEN 143 TAGE NACH INITIALER INFEKTION	83
ABBILDUNG 22: MESSUNG DER UMGEBUNGSTEMPERATUR UND LUFTFEUCHTIGKEIT IM QUARTIER DER FLEDERMAUSKOLONIE IM DORF KOFFIKRO AN DER ELFENBEINKÜSTE	84
ABBILDUNG 23: WACHSTUM VERSCHIEDENER ZELLKULTUREN BEI 27°C, 37°C UND 42°C.....	86
ABBILDUNG 24: VERGLEICH DES NPC1-REZEPTOR-EXPRESSIONSLEVELS IN MOKI- UND MOKI_LT-ZELLEN	88
ABBILDUNG 25: EBOV- UND MARV-REPLIKATION BEI UNTERSCHIEDLICHEN KONSTANTEN TEMPERATUREN	89
ABBILDUNG 26: EBOV-REPLIKATIONSKINETIK BEI WECHSEL DER INKUBATIONSTEMPERATUR	91
ABBILDUNG 27: GEGENÜBERSTELLUNG VON NPC1-REZEPTOR- EXPRESSIONSLEVEL UND EBOV-REPLIKATIONSRATE	102

6.3 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: PCR-PROTOKOLL UND CYCLER-BEDINGUNGEN FÜR DIE FLEDERMAUSSPEZIES-PCR.....	43
TABELLE 2: SEQUENZIERUNGSANSATZ UND CYCLER-BEDINGUNGEN.....	44
TABELLE 3: PCR-PROTOKOLL UND CYCLER-BEDINGUNGEN FÜR CDNA-SYNTHESE....	49
TABELLE 4: PCR-PROTOKOLL UND CYCLER-BEDINGUNGEN FÜR ZWEITSTRANGSYNTHESE CDNA.....	49
TABELLE 5: PCR-PROTOKOLL UND CYCLER-BEDINGUNGEN FÜR DIE AMPLIFIKATION DER DNA DURCH RANDOM-PCR.....	50
TABELLE 6: LISTE DER VERWENDETEN FLEDERMAUSORGANE BZW. -GEWEBE UND DER DARAUS ENTWICKELTEN ZELLKULTUREN	59
TABELLE 7: NPC1-REZEPTOR-EXPRESSIONSLEVEL IN UNTERSCHIEDLICHEN FLEDERMAUSZELLKULTUREN, HUMANEN UND AFFENZELLINIEN BESTIMMT MIT KONFOKALER MIKROSKOPIE UND DURCHFLUSSZYTOMETRIE.....	65
TABELLE 8: X-FACHE VERMEHRUNG DER EBOLAVIRALEN RNA BEI DER REPLIKATION IN UNTERSCHIEDLICHEN ZELLKULTUREN	73
TABELLE 9: X-FACHE VERMEHRUNG DER EBOLAVIRALEN RNA BEI UNTERSCHIEDLICHEN INKUBATIONSTEMPERATUREN.....	92

6.4 Literaturverzeichnis

1. Amarasinghe G. K., Ayllón M. A., Bào Y., Basler C. F., Bavari S., Blasdel K. R., et al. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2019. *Arch Virol*. 2019;164(7):1967-80. doi: 10.1007/s00705-019-04247-4.
2. Kuhn J. H., Amarasinghe G. K., Basler C. F., Bavari S., Bukreyev A., Chandran K., et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Filoviridae. *J Gen Virol*. 2019;100(6):911-2. doi: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001252>.
3. Robert Koch Institute - Centre for Biological Threats and Special Pathogens. Electron micrograph of Ebola virus particle. 2019.
4. Cantoni D., Rossman J. S. Ebolaviruses: New roles for old proteins. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(5):e0006349-e. doi: 10.1371/journal.pntd.0006349. PubMed PMID: 29723187.
5. Centers for Disease Control and Prevention. Viral Hemorrhagic Fevers (VHFs) - Filoviridae 2018 [updated September 18, 2018]. Available from: <https://www.cdc.gov/vhf/virus-families/filoviridae.html>.
6. Negredo A., Palacios G., Vazquez-Moron S., Gonzalez F., Dopazo H., Molero F., et al. Discovery of an ebolavirus-like filovirus in europe. *PLoS Pathog*. 2011;7(10):e1002304. doi: 10.1371/journal.ppat.1002304. PubMed PMID: 22039362; PubMed Central PMCID: PMC3197594.
7. Yang X. L., Tan C. W., Anderson D. E., Jiang R. D., Li B., Zhang W., et al. Characterization of a filovirus (Mengla virus) from Rousettus bats in China. *Nat Microbiol*. 2019. Epub 2019/01/09. doi: 10.1038/s41564-018-0328-y. PubMed PMID: 30617348.
8. Kuhn J. H., Adachi T., Adhikari N. K. J., Arribas J. R., Bah I. E., Bausch D. G., et al. New filovirus disease classification and nomenclature. *Nat Rev Microbiol*. 2019;17(5):261-3. Epub 2019/03/31. doi: 10.1038/s41579-019-0187-4. PubMed PMID: 30926957; PubMed Central PMCID: PMCPMC6637750.
9. Johnson E. D., Johnson B. K., Silverstein D., Tukei P., Geisbert T. W., Sanchez A. N., et al. Characterization of a new Marburg virus isolated from a 1987 fatal case in Kenya. *Arch Virol Suppl*. 1996;11:101-14. Epub 1996/01/01. doi: 10.1007/978-3-7091-7482-1_10. PubMed PMID: 8800792.
10. World Health Organization. Marburg virus disease 2018. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/marburg-virus-disease>.
11. Schwartz D.A. Maternal Filovirus Infection and Death from Marburg and Ravn Viruses: Highly Lethal to Pregnant Women and Their Fetuses Similar to Ebola Virus. *Emerging Challenges in Filovirus Infections* 2019.
12. World Health Organization. Ebola virus disease 2018. Available from: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ebola-virus-disease>.

13. Goldstein T., Anthony S. J., Gbakima A., Bird B. H., Bangura J., Tremeau-Bravard A., et al. The discovery of Bombali virus adds further support for bats as hosts of ebolaviruses. *Nat Microbiol.* 2018. Epub 2018/08/29. doi: 10.1038/s41564-018-0227-2. PubMed PMID: 30150734.
14. Centers for Disease Control and Prevention. History of Ebola Virus Disease 2020. Available from: <https://www.cdc.gov/vhf/ebola/history/distribution-map.html>.
15. European Centre for Disease Prevention and Control. Ongoing Ebola virus disease outbreak, Democratic Republic of the Congo 2020 [updated 20 September 2019]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/ebola-virus-disease-outbreak-democratic-republic-congo-ongoing>.
16. Inungu J., Iheduru-Anderson K., Odio O. J. Recurrent Ebolavirus disease in the Democratic Republic of Congo: update and challenges. *AIMS public health.* 2019;6(4):502-13. doi: 10.3934/publichealth.2019.4.502. PubMed PMID: 31909070.
17. Médecins Sans Frontières. Crisis Update 2020. Available from: <https://www.msf.org/drc-ebola-outbreak-crisis-update>.
18. World Health Organization. New Ebola outbreak detected in northwest Democratic Republic of the Congo; WHO surge team supporting the response 2020. Available from: <https://www.who.int/news-room/detail/01-06-2020-new-ebola-outbreak-detected-in-northwest-democratic-republic-of-the-congo-who-surge-team-supporting-the-response>.
19. Singh S.K., Ruzek D. *Viral Hemorrhagic Fevers*. Boca Raton: Taylor & Francis Ltd; 2019.
20. Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin. TRBA 462 Einstufung von Viren in Risikogruppen 2012. Available from: <https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/TRBA-462.html>.
21. Centers for Disease Control and Prevention. Bioterrorism Agents/Diseases 2018. Available from: <https://emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp>.
22. Baseler L., Chertow D. S., Johnson K. M., Feldmann H., Morens D. M. The Pathogenesis of Ebola Virus Disease. *Annu Rev Pathol.* 2017;12:387-418. Epub 2016/12/14. doi: 10.1146/annurev-pathol-052016-100506. PubMed PMID: 27959626.
23. Martinez R. B., Ng D. L., Greer P. W., Rollin P. E., Zaki S. R. Tissue and cellular tropism, pathology and pathogenesis of Ebola and Marburg viruses. *J Pathol.* 2015;235(2):153-74. doi: 10.1002/path.4456. PubMed PMID: 25297522.
24. Ververs M., Arya A. Ebola virus disease and breastfeeding: time for attention. *Lancet.* 2019;394(10201):825. Epub 2019/09/01. doi: 10.1016/s0140-6736(19)32005-7. PubMed PMID: 31470987.

25. Schindell B. G., Webb A. L., Kindrachuk J. Persistence and Sexual Transmission of Filoviruses. *Viruses*. 2018;10(12). Epub 2018/12/06. doi: 10.3390/v10120683. PubMed PMID: 30513823; PubMed Central PMCID: PMC6316729.
26. Falasca L., Agrati C., Petrosillo N., Di Caro A., Capobianchi M. R., Ippolito G., et al. Molecular mechanisms of Ebola virus pathogenesis: focus on cell death. *Cell Death Differ*. 2015;22(8):1250-9. doi: 10.1038/cdd.2015.67. PubMed PMID: 26024394; PubMed Central PMCID: PMC4495366.
27. Marcinkiewicz J., Bryniarski K., Nazimek K. Ebola haemorrhagic fever virus: pathogenesis, immune responses, potential prevention. *Folia Med Cracov*. 2014;54(3):39-48. PubMed PMID: 25694094.
28. Kourtis A. P., Appelgren K., Chevalier M. S., McElroy A. Ebola Virus Disease: Focus on Children. *The Pediatric infectious disease journal*. 2015;34(8):893-7. doi: 10.1097/INF.0000000000000707. PubMed PMID: 25831417.
29. Zampieri C. A., Sullivan N. J., Nabel G. J. Immunopathology of highly virulent pathogens: insights from Ebola virus. *Nat Immunol*. 2007;8(11):1159-64. doi: 10.1038/ni1519. PubMed PMID: 17952040.
30. Rhein B. A., Maury W. J. Ebola virus entry into host cells: identifying therapeutic strategies. *Curr Clin Microbiol Rep*. 2015;2(3):115-24. Epub 2015/10/29. doi: 10.1007/s40588-015-0021-3. PubMed PMID: 26509109; PubMed Central PMCID: PMC64617201.
31. Hofmann-Winkler H., Kaup F., Pohlmann S. Host cell factors in filovirus entry: novel players, new insights. *Viruses*. 2012;4(12):3336-62. Epub 2013/01/25. PubMed PMID: 23342362; PubMed Central PMCID: PMC3528269.
32. Salata C., Calistri A., Alvisi G., Celestino M., Parolin C., Palu G. Ebola Virus Entry: From Molecular Characterization to Drug Discovery. *Viruses*. 2019;11(3). Epub 2019/03/22. doi: 10.3390/v11030274. PubMed PMID: 30893774; PubMed Central PMCID: PMC6466262.
33. Lennemann N. J., Rhein B. A., Ndungo E., Chandran K., Qiu X., Maury W. Comprehensive functional analysis of N-linked glycans on Ebola virus GP1. *mBio*. 2014;5(1):e00862-13. Epub 2014/01/30. doi: 10.1128/mBio.00862-13. PubMed PMID: 24473128; PubMed Central PMCID: PMC3950510.
34. Alvarez C. P., Lasala F., Carrillo J., Muniz O., Corbi A. L., Delgado R. C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in cis and in trans. *J Virol*. 2002;76(13):6841-4. Epub 2002/06/07. doi: 10.1128/jvi.76.13.6841-6844.2002. PubMed PMID: 12050398; PubMed Central PMCID: PMC136246.
35. Brudner M., Karpel M., Lear C., Chen L., Yantosca L. M., Scully C., et al. Lectin-dependent enhancement of Ebola virus infection via soluble and transmembrane C-type lectin receptors. *PLoS One*. 2013;8(4):e60838. Epub 2013/04/11. doi: 10.1371/journal.pone.0060838. PubMed PMID: 23573288; PubMed Central PMCID: PMC3614905.

36. Simmons G., Reeves J. D., Grogan C. C., Vandenberghe L. H., Baribaud F., Whitbeck J. C., et al. DC-SIGN and DC-SIGNR bind ebola glycoproteins and enhance infection of macrophages and endothelial cells. *Virology*. 2003;305(1):115-23. Epub 2002/12/31. doi: 10.1006/viro.2002.1730. PubMed PMID: 12504546.
37. Takada A., Fujioka K., Tsuiji M., Morikawa A., Higashi N., Ebihara H., et al. Human macrophage C-type lectin specific for galactose and N-acetylgalactosamine promotes filovirus entry. *J Virol*. 2004;78(6):2943-7. Epub 2004/03/03. doi: 10.1128/jvi.78.6.2943-2947.2004. PubMed PMID: 14990712; PubMed Central PMCID: PMC353724.
38. Powlesland A. S., Fisch T., Taylor M. E., Smith D. F., Tissot B., Dell A., et al. A novel mechanism for LSECtin binding to Ebola virus surface glycoprotein through truncated glycans. *J Biol Chem*. 2008;283(1):593-602. Epub 2007/11/07. doi: 10.1074/jbc.M706292200. PubMed PMID: 17984090; PubMed Central PMCID: PMC2275798.
39. Marzi A., Akhavan A., Simmons G., Gramberg T., Hofmann H., Bates P., et al. The signal peptide of the ebolavirus glycoprotein influences interaction with the cellular lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol*. 2006;80(13):6305-17. Epub 2006/06/16. doi: 10.1128/jvi.02545-05. PubMed PMID: 16775318; PubMed Central PMCID: PMC1488929.
40. Marzi A., Moller P., Hanna S. L., Harrer T., Eisemann J., Steinkasserer A., et al. Analysis of the interaction of Ebola virus glycoprotein with DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin) and its homologue DC-SIGNR. *J Infect Dis*. 2007;196 Suppl 2:S237-46. Epub 2007/12/06. doi: 10.1086/520607. PubMed PMID: 17940955.
41. Kondratowicz A. S., Lennemann N. J., Sinn P. L., Davey R. A., Hunt C. L., Moller-Tank S., et al. T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 (TIM-1) is a receptor for Zaire Ebolavirus and Lake Victoria Marburgvirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(20):8426-31. Epub 2011/05/04. doi: 10.1073/pnas.1019030108. PubMed PMID: 21536871; PubMed Central PMCID: PMC3100998.
42. Jemielity S., Wang J. J., Chan Y. K., Ahmed A. A., Li W., Monahan S., et al. TIM-family Proteins Promote Infection of Multiple Enveloped Viruses through Virion-associated Phosphatidylserine. *PLoS Pathog*. 2013;9(3):e1003232. doi: 10.1371/journal.ppat.1003232.
43. Moller-Tank S., Kondratowicz A. S., Davey R. A., Rennert P. D., Maury W. Role of the phosphatidylserine receptor TIM-1 in enveloped-virus entry. *J Virol*. 2013;87(15):8327-41. Epub 2013/05/24. doi: 10.1128/jvi.01025-13. PubMed PMID: 23698310; PubMed Central PMCID: PMC3719829.
44. Shimojima M., Ikeda Y., Kawaoka Y. The mechanism of Axl-mediated Ebola virus infection. *J Infect Dis*. 2007;196 Suppl 2:S259-63. Epub 2007/12/06. doi: 10.1086/520594. PubMed PMID: 17940958.
45. Brindley M. A., Hunt C. L., Kondratowicz A. S., Bowman J., Sinn P. L., McCray P. B., et al. Tyrosine kinase receptor Axl enhances entry of Zaire ebolavirus without direct interactions with the viral glycoprotein. *Virology*. 2011;415(2):83-94. doi: 10.1016/j.virol.2011.04.002. PubMed PMID: PMC3107944.

46. Hunt C. L., Kolokoltsov A. A., Davey R. A., Maury W. The Tyro3 receptor kinase Axl enhances macropinocytosis of Zaire ebolavirus. *J Virol.* 2011;85(1):334-47. Epub 2010/11/05. doi: 10.1128/jvi.01278-09. PubMed PMID: 21047970; PubMed Central PMCID: PMC3014168.
47. Shimojima M., Takada A., Ebihara H., Neumann G., Fujioka K., Irimura T., et al. Tyro3 family-mediated cell entry of Ebola and Marburg viruses. *J Virol.* 2006;80(20):10109-16. Epub 2006/09/29. doi: 10.1128/jvi.01157-06. PubMed PMID: 17005688; PubMed Central PMCID: PMC1617303.
48. Schornberg K. L., Shoemaker C. J., Dube D., Abshire M. Y., Delos S. E., Bouton A. H., et al. Alpha5beta1-integrin controls ebolavirus entry by regulating endosomal cathepsins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(19):8003-8. Epub 2009/05/07. doi: 10.1073/pnas.0807578106. PubMed PMID: 19416892; PubMed Central PMCID: PMC2683081.
49. Saeed M. F., Kolokoltsov A. A., Albrecht T., Davey R. A. Cellular entry of ebola virus involves uptake by a macropinocytosis-like mechanism and subsequent trafficking through early and late endosomes. *PLoS Pathog.* 2010;6(9):e1001110. Epub 2010/09/24. doi: 10.1371/journal.ppat.1001110. PubMed PMID: 20862315; PubMed Central PMCID: PMC2940741.
50. Nanbo A., Imai M., Watanabe S., Noda T., Takahashi K., Neumann G., et al. Ebolavirus is internalized into host cells via macropinocytosis in a viral glycoprotein-dependent manner. *PLoS Pathog.* 2010;6(9):e1001121. Epub 2010/10/05. doi: 10.1371/journal.ppat.1001121. PubMed PMID: 20886108; PubMed Central PMCID: PMC2944813.
51. Mulherkar N., Raaben M., de la Torre J. C., Whelan S. P., Chandran K. The Ebola virus glycoprotein mediates entry via a non-classical dynamin-dependent macropinocytic pathway. *Virology.* 2011;419(2):72-83. Epub 2011/09/13. doi: 10.1016/j.virol.2011.08.009. PubMed PMID: 21907381; PubMed Central PMCID: PMC3177976.
52. Lee J. E., Saphire E. O. Ebolavirus glycoprotein structure and mechanism of entry. *Future Virol.* 2009;4(6):621-35. Epub 2009/01/01. doi: 10.2217/fvl.09.56. PubMed PMID: 20198110; PubMed Central PMCID: PMC2829775.
53. Dube D., Brecher M. B., Delos S. E., Rose S. C., Park E. W., Schornberg K. L., et al. The primed ebolavirus glycoprotein (19-kilodalton GP1,2): sequence and residues critical for host cell binding. *J Virol.* 2009;83(7):2883-91. Epub 2009/01/16. doi: 10.1128/jvi.01956-08. PubMed PMID: 19144707; PubMed Central PMCID: PMC2655554.
54. Chandran K., Sullivan N. J., Felbor U., Whelan S. P., Cunningham J. M. Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection. *Science.* 2005;308(5728):1643-5. Epub 2005/04/16. doi: 10.1126/science.1110656. PubMed PMID: 15831716; PubMed Central PMCID: PMC24797943.

55. Schornberg K., Matsuyama S., Kabsch K., Delos S., Bouton A., White J. Role of endosomal cathepsins in entry mediated by the Ebola virus glycoprotein. *J Virol.* 2006;80(8):4174-8. Epub 2006/03/31. doi: 10.1128/jvi.80.8.4174-4178.2006. PubMed PMID: 16571833; PubMed Central PMCID: PMCPMC1440424.
56. Brecher M., Schornberg K. L., Delos S. E., Fusco M. L., Saphire E. O., White J. M. Cathepsin cleavage potentiates the Ebola virus glycoprotein to undergo a subsequent fusion-relevant conformational change. *J Virol.* 2012;86(1):364-72. Epub 2011/10/28. doi: 10.1128/jvi.05708-11. PubMed PMID: 22031933; PubMed Central PMCID: PMCPMC3255896.
57. Bornholdt Z. A., Ndungo E., Fusco M. L., Bale S., Flyak A. I., Crowe J. E., Jr., et al. Host-Primed Ebola Virus GP Exposes a Hydrophobic NPC1 Receptor-Binding Pocket, Revealing a Target for Broadly Neutralizing Antibodies. *mBio.* 2016;7(1):e02154-15. Epub 2016/02/26. doi: 10.1128/mBio.02154-15. PubMed PMID: 26908579; PubMed Central PMCID: PMCPMC4791852.
58. Krishnan A., Miller E. H., Herbert A. S., Ng M., Ndungo E., Whelan S. P., et al. Niemann-Pick C1 (NPC1)/NPC1-like1 chimeras define sequences critical for NPC1's function as a flavivirus entry receptor. *Viruses.* 2012;4(11):2471-84. Epub 2012/12/04. doi: 10.3390/v4112471. PubMed PMID: 23202491; PubMed Central PMCID: PMCPMC3509659.
59. White J. M., Schornberg K. L. A new player in the puzzle of filovirus entry. *Nat Rev Microbiol.* 2012;10(5):317-22. Epub 2012/04/12. doi: 10.1038/nrmicro2764. PubMed PMID: 22491356; PubMed Central PMCID: PMCPMC3540776.
60. Carette J. E., Raaben M., Wong A. C., Herbert A. S., Obernosterer G., Mulherkar N., et al. Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1. *Nature.* 2011;477(7364):340-3. doi: 10.1038/nature10348. PubMed PMID: 21866103; PubMed Central PMCID: PMCPMC3175325.
61. Cote M., Misasi J., Ren T., Bruchez A., Lee K., Filone C. M., et al. Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection. *Nature.* 2011;477(7364):344-8. Epub 2011/08/26. doi: 10.1038/nature10380. PubMed PMID: 21866101; PubMed Central PMCID: PMCPMC3230319.
62. Miller E. H., Obernosterer G., Raaben M., Herbert A. S., Deffieu M. S., Krishnan A., et al. Ebola virus entry requires the host-programmed recognition of an intracellular receptor. *EMBO J.* 2012;31(8):1947-60. Epub 2012/03/08. doi: 10.1038/emboj.2012.53. PubMed PMID: 22395071; PubMed Central PMCID: PMCPMC3343336.
63. Haines K. M., Vande Burgt N. H., Francica J. R., Kaletsky R. L., Bates P. Chinese hamster ovary cell lines selected for resistance to ebolavirus glycoprotein mediated infection are defective for NPC1 expression. *Virology.* 2012;432(1):20-8. Epub 2012/06/26. doi: 10.1016/j.virol.2012.05.018. PubMed PMID: 22726751; PubMed Central PMCID: PMCPMC3402687.
64. Herbert A. S., Davidson C., Kuehne A. I., Bakken R., Braigen S. Z., Gunn K. E., et al. Niemann-pick C1 is essential for ebolavirus replication and pathogenesis in vivo. *MBio.* 2015;6(3):e00565-15. Epub 2015/05/28. doi: 10.1128/mBio.00565-15. PubMed PMID: 26015498; PubMed Central PMCID: PMCPMC4447246.

65. Schmidt T., Samaras P., Frejno M., Gessulat S., Barnert M., Kienegger H., et al. ProteomicsDB. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D1271-D81. doi: 10.1093/nar/gkx1029.
66. Younan P., Santos R. I., Ramanathan P., Iampietro M., Nishida A., Dutta M., et al. Ebola virus-mediated T-lymphocyte depletion is the result of an abortive infection. *PLoS Pathog.* 2019;15(10):e1008068. Epub 2019/10/28. doi: 10.1371/journal.ppat.1008068. PubMed PMID: 31648236; PubMed Central PMCID: PMC6812753.
67. Dahlmann F., Biedenkopf N., Babler A., Jahnen-Dechent W., Karsten C. B., Gnirß K., et al. Analysis of Ebola Virus Entry Into Macrophages. *The Journal of Infectious Diseases.* 2015;212(Suppl 2):S247-S57. doi: 10.1093/infdis/jiv140. PubMed PMID: PMC4564540.
68. Uhlen M., Bjorling E., Agaton C., Szgyarto C. A., Amini B., Andersen E., et al. A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics 2005 [updated Dec; cited 4 12]. 2005/08/30:[1920-32]. Available from: <https://proteinatlas.org>.
69. Ponten F., Jirstrom K., Uhlen M. The Human Protein Atlas--a tool for pathology 2008 [updated Dec; cited 216 4]. 2008/10/15:[387-93]. Available from: <https://proteinatlas.org>.
70. Uhlen M., Oksvold P., Fagerberg L., Lundberg E., Jonasson K., Forsberg M., et al. Towards a knowledge-based Human Protein Atlas 2010 [updated Dec; cited 28 12]. 2010/12/09:[1248-50]. Available from: <https://proteinatlas.org>.
71. Carstea E. D., Morris J. A., Coleman K. G., Loftus S. K., Zhang D., Cummings C., et al. Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science.* 1997;277(5323):228-31. Epub 1997/07/11. PubMed PMID: 9211849.
72. Newton J., Milstien S., Spiegel S. Niemann-Pick type C disease: The atypical sphingolipidosis. *Adv Biol Regul.* 2018. Epub 2018/09/13. doi: 10.1016/j.jbior.2018.08.001. PubMed PMID: 30205942.
73. Vanier M. T. Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J Rare Dis.* 2010;5:16. Epub 2010/06/08. doi: 10.1186/1750-1172-5-16. PubMed PMID: 20525256; PubMed Central PMCID: PMC2902432.
74. Randall R. E., Griffin D. E. Within host RNA virus persistence: mechanisms and consequences. *Curr Opin Virol.* 2017;23:35-42. Epub 2017/03/17. doi: 10.1016/j.coviro.2017.03.001. PubMed PMID: 28319790.
75. Domingo E., Baranowski E., Ruiz-Jarabo C. M., Martín-Hernández A. M., Sáiz J. C., Escarmís C. Quasispecies structure and persistence of RNA viruses. *Emerg Infect Dis.* 1998;4(4):521-7. doi: 10.3201/eid0404.980402. PubMed PMID: 9866728.
76. Moonen P., Schrijver R. Carriers of foot-and-mouth disease virus: a review. *Vet Q.* 2000;22(4):193-7. Epub 2000/11/22. doi: 10.1080/01652176.2000.9695056. PubMed PMID: 11087128.

77. Salt J. S. The carrier state in foot and mouth disease--an immunological review. *Br Vet J.* 1993;149(3):207-23. Epub 1993/05/01. doi: 10.1016/s0007-1935(05)80168-x. PubMed PMID: 8392891.
78. Mayr A., Danner K. Persistent infections caused by Borna virus. *Infection.* 1974;2(2):64-9. Epub 1974/01/01. doi: 10.1007/bf01642023. PubMed PMID: 4601953.
79. Honda T. Neuropathogenesis of persistent infection with Borna disease virus. *Uirusu.* 2015;65(1):145-54. Epub 2016/03/01. doi: 10.2222/jsv.65.145. PubMed PMID: 26923969.
80. Henkel M., Planz O., Fischer T., Stitz L., Rziha H. J. Prevention of virus persistence and protection against immunopathology after Borna disease virus infection of the brain by a novel Orf virus recombinant. *J Virol.* 2005;79(1):314-25. Epub 2004/12/15. doi: 10.1128/jvi.79.1.314-325.2005. PubMed PMID: 15596826; PubMed Central PMCID: PMC538698.
81. Schwartz-Cornil I., Mertens P. P., Contreras V., Hemati B., Pascale F., Breard E., et al. Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. *Vet Res.* 2008;39(5):46. Epub 2008/05/23. doi: 10.1051/vetres:2008023. PubMed PMID: 18495078.
82. Takamatsu H., Mellor P. S., Mertens P. P. C., Kirkham P. A., Burroughs J. N., Parkhouse R. M. E. A possible overwintering mechanism for bluetongue virus in the absence of the insect vector FN1. *J Gen Virol.* 2003;84(1):227-35. doi: <https://doi.org/10.1099/vir.0.18705-0>.
83. Garg R. K. Subacute sclerosing panencephalitis. *Postgrad Med J.* 2002;78(916):63-70. Epub 2002/01/25. doi: 10.1136/pmj.78.916.63. PubMed PMID: 11807185; PubMed Central PMCID: PMC51742261.
84. Doi T., Kwon H. J., Honda T., Sato H., Yoneda M., Kai C. Measles virus induces persistent infection by autoregulation of viral replication. *Sci Rep.* 2016;6:37163. Epub 2016/11/25. doi: 10.1038/srep37163. PubMed PMID: 27883010; PubMed Central PMCID: PMC5121633.
85. Watanabe S., Shirogane Y., Sato Y., Hashiguchi T., Yanagi Y. New Insights into Measles Virus Brain Infections. *Trends Microbiol.* 2019;27(2):164-75. Epub 2018/09/18. doi: 10.1016/j.tim.2018.08.010. PubMed PMID: 30220445.
86. Chigbu D. I., Loonawat R., Sehgal M., Patel D., Jain P. Hepatitis C Virus Infection: Host(-)Virus Interaction and Mechanisms of Viral Persistence. *Cells.* 2019;8(4). Epub 2019/04/28. doi: 10.3390/cells8040376. PubMed PMID: 31027278; PubMed Central PMCID: PMC6523734.
87. Pawlotsky J. M. Hepatitis C virus infection: virus/host interactions. *J Viral Hepat.* 1998;5 Suppl 1:3-8. Epub 1998/10/31. doi: 10.1046/j.1365-2893.1998.0050s1003.x. PubMed PMID: 9795922.
88. Kanto T., Hayashi N. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection: multifaceted strategies subverting innate and adaptive immunity. *Intern Med.* 2006;45(4):183-91. Epub 2006/03/18. doi: 10.2169/internalmedicine.45.1530. PubMed PMID: 16543687.

89. Kurscheidt F. A., Mesquita C. S. S., Damke Gmzf, Damke E., Carvalho Arba, Suehiro T. T., et al. Persistence and clinical relevance of Zika virus in the male genital tract. *Nat Rev Urol.* 2019;16(4):211-30. Epub 2019/01/31. doi: 10.1038/s41585-019-0149-7. PubMed PMID: 30696994.
90. Swartwout B. K., Zlotnick M. G., Saver A. E., McKenna C. M., Bertke A. S. Zika Virus Persistently and Productively Infects Primary Adult Sensory Neurons In Vitro. *Pathogens.* 2017;6(4). Epub 2017/10/14. doi: 10.3390/pathogens6040049. PubMed PMID: 29027940; PubMed Central PMCID: PMC5750573.
91. Mladinich M. C., Schwedes J., Mackow E. R. Zika Virus Persistently Infects and Is Basolaterally Released from Primary Human Brain Microvascular Endothelial Cells. *mBio.* 2017;8(4). Epub 2017/07/13. doi: 10.1128/mBio.00952-17. PubMed PMID: 28698279; PubMed Central PMCID: PMC5513708.
92. Ron D., Tal J. Coevolution of cells and virus as a mechanism for the persistence of lymphotropic minute virus of mice in L-cells. *J Virol.* 1985;55(2):424-30. Epub 1985/08/01. PubMed PMID: 2410631; PubMed Central PMCID: PMC5254950.
93. de la Torre J. C., Martinez-Salas E., Diez J., Villaverde A., Gebauer F., Rocha E., et al. Coevolution of cells and viruses in a persistent infection of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J Virol.* 1988;62(6):2050-8. Epub 1988/06/01. PubMed PMID: 2835509; PubMed Central PMCID: PMC5253290.
94. Herrera M., Grande-Perez A., Perales C., Domingo E. Persistence of foot-and-mouth disease virus in cell culture revisited: implications for contingency in evolution. *J Gen Virol.* 2008;89(Pt 1):232-44. Epub 2007/12/20. doi: 10.1099/vir.0.83312-0. PubMed PMID: 18089747.
95. Lemay G. Viral persistence of mammalian reovirus in cell culture: a model of virus-cell coevolution. *Virologie (Montrouge).* 2019;23(5):5-15. Epub 2019/12/13. doi: 10.1684/vir.2019.0791. PubMed PMID: 31826852.
96. Holland JJ., Kennedy, IT., Semler, BL., Jones, CL., Roux, L., Grabau, EA. Defective interfering RNA viruses and the host-cell response. *Comprehensive Virology.* Vol. 16: Plenum Press; 1980. p. p. 137-92.
97. Roux L., Simon A. E., Holland J. J. Effects of defective interfering viruses on virus replication and pathogenesis in vitro and in vivo. *Adv Virus Res.* 1991;40:181-211. Epub 1991/01/01. doi: 10.1016/s0065-3527(08)60279-1. PubMed PMID: 1957718.
98. Manzoni T. B., Lopez C. B. Defective (interfering) viral genomes re-explored: impact on antiviral immunity and virus persistence. *Future Virol.* 2018;13(7):493-503. Epub 2018/09/25. doi: 10.2217/fvl-2018-0021. PubMed PMID: 30245734; PubMed Central PMCID: PMC6136085.
99. Schmaljohn C., Blair C. D. Persistent infection of cultured mammalian cells by Japanese encephalitis virus. *J Virol.* 1977;24(2):580-9. Epub 1977/11/01. PubMed PMID: 916028; PubMed Central PMCID: PMC515969.

100. Kennedy J. C., Macdonald R. D. Persistent infection with infectious pancreatic necrosis virus mediated by defective-interfering (DI) virus particles in a cell line showing strong interference but little DI replication. *J Gen Virol.* 1982;58(Pt 2):361-71. Epub 1982/02/01. doi: 10.1099/0022-1317-58-2-361. PubMed PMID: 7061991.
101. Calain P., Monroe M. C., Nichol S. T. Ebola virus defective interfering particles and persistent infection. *Virology.* 1999;262(1):114-28. Epub 1999/09/18. doi: 10.1006/viro.1999.9915. PubMed PMID: 10489346.
102. McCarthy M. K., Morrison T. E. Persistent RNA virus infections: do PAMPS drive chronic disease? *Curr Opin Virol.* 2017;23:8-15. Epub 2017/02/20. doi: 10.1016/j.coviro.2017.01.003. PubMed PMID: 28214732; PubMed Central PMCID: PMC5474173.
103. Niederkorn J. Y., Stein-Streilein J. History and physiology of immune privilege. *Ocul Immunol Inflamm.* 2010;18(1):19-23. Epub 2010/02/05. doi: 10.3109/09273940903564766. PubMed PMID: 20128645.
104. Daneman R., Prat A. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(1):a020412-a. doi: 10.1101/cshperspect.a020412. PubMed PMID: 25561720.
105. Cunha-Vaz J. The blood-ocular barriers. *Surv Ophthalmol.* 1979;23(5):279-96. Epub 1979/03/01. doi: 10.1016/0039-6257(79)90158-9. PubMed PMID: 380030.
106. Forrester J. V., Xu H. Good news-bad news: the Yin and Yang of immune privilege in the eye. *Front Immunol.* 2012;3:338-. doi: 10.3389/fimmu.2012.00338. PubMed PMID: 23230433.
107. Cheng C. Y., Mruk D. D. The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacol Rev.* 2012;64(1):16-64. Epub 2011/11/01. doi: 10.1124/pr.110.002790. PubMed PMID: 22039149; PubMed Central PMCID: PMC3250082.
108. Adalja A. A. Sanctuary Sites: What Lies Behind Ebola Eye Infections, Sexual Transmission, and Relapses. *Health Secur.* 2015;13(6):396-8. Epub 2015/11/21. doi: 10.1089/hs.2015.28999.aaa. PubMed PMID: 26588797.
109. Zhao S., Zhu W., Xue S., Han D. Testicular defense systems: immune privilege and innate immunity. *Cell Mol Immunol.* 2014;11(5):428-37. Epub 2014/06/24. doi: 10.1038/cmi.2014.38. PubMed PMID: 24954222; PubMed Central PMCID: PMC4197207.
110. Heeney J. L. Ebola: Hidden reservoirs. *Nature.* 2015;527(7579):453-5. Epub 2015/11/27. doi: 10.1038/527453a. PubMed PMID: 26607539.
111. Den Boon S., Marston B. J., Nyenswah T. G., Jambai A., Barry M., Keita S., et al. Ebola Virus Infection Associated with Transmission from Survivors. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(2):249-55. Epub 2018/12/01. doi: 10.3201/eid2502.181011. PubMed PMID: 30500321; PubMed Central PMCID: PMC6346469.
112. Rivera A., Messaoudi I. Molecular mechanisms of Ebola pathogenesis. *J Leukoc Biol.* 2016;100(5):889-904. Epub 2016/11/02. doi: 10.1189/jlb.4RI0316-099RR. PubMed PMID: 27587404; PubMed Central PMCID: PMC46608070.

113. Zeng X., Blancett C. D., Koistinen K. A., Schellhase C. W., Bearss J. J., Radoshitzky S. R., et al. Identification and pathological characterization of persistent asymptomatic Ebola virus infection in rhesus monkeys. *Nat Microbiol.* 2017;2:17113. Epub 2017/07/18. doi: 10.1038/nmicrobiol.2017.113. PubMed PMID: 28715405.
114. Coffin K. M., Liu J., Warren T. K., Blancett C. D., Kuehl K. A., Nichols D. K., et al. Persistent Marburg Virus Infection in the Testes of Nonhuman Primate Survivors. *Cell Host Microbe.* 2018;24(3):405-16.e3. Epub 2018/09/04. doi: 10.1016/j.chom.2018.08.003. PubMed PMID: 30173956.
115. Chughtai A. A., Barnes M., Macintyre C. R. Persistence of Ebola virus in various body fluids during convalescence: evidence and implications for disease transmission and control. *Epidemiol Infect.* 2016;144(8):1652-60. Epub 2016/01/25. doi: 10.1017/S0950268816000054. PubMed PMID: 26808232.
116. Varkey J. B., Shantha J. G., Crozier I., Kraft C. S., Lyon G. M., Mehta A. K., et al. Persistence of Ebola Virus in Ocular Fluid during Convalescence. *N Engl J Med.* 2015;372(25):2423-7. doi: 10.1056/NEJMoa1500306. PubMed PMID: 25950269.
117. Sissoko D., Duraffour S., Kerber R., Kolie J. S., Beavogui A. H., Camara A. M., et al. Persistence and clearance of Ebola virus RNA from seminal fluid of Ebola virus disease survivors: a longitudinal analysis and modelling study. *Lancet Glob Health.* 2017;5(1):e80-e8. Epub 2016/12/14. doi: 10.1016/s2214-109x(16)30243-1. PubMed PMID: 27955791.
118. Fischer W. A., Brown J., Wohl D. A., Loftis A. J., Tozay S., Reeves E., et al. Ebola Virus Ribonucleic Acid Detection in Semen More Than Two Years After Resolution of Acute Ebola Virus Infection. *Open Forum Infect Dis.* 2017;4(3):ofx155. Epub 2018/04/20. doi: 10.1093/ofid/ofx155. PubMed PMID: 29670927; PubMed Central PMCID: PMC5897835.
119. Deen G. F., Broutet N., Xu W., Knust B., Sesay F. R., McDonald S. L. R., et al. Ebola RNA Persistence in Semen of Ebola Virus Disease Survivors - Final Report. *N Engl J Med.* 2017;377(15):1428-37. Epub 2015/10/16. doi: 10.1056/NEJMoa1511410. PubMed PMID: 26465681; PubMed Central PMCID: PMC5798881.
120. Jacobs M., Rodger A., Bell D. J., Bhagani S., Cropley I., Filipe A., et al. Late Ebola virus relapse causing meningoencephalitis: a case report. *Lancet (London, England).* 2016;388(10043):498-503. Epub 2016/05/18. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30386-5. PubMed PMID: 27209148.
121. Mate S. E., Kugelman J. R., Nyenswah T. G., Ladner J. T., Wiley M. R., Cordier-Lassalle T., et al. Molecular Evidence of Sexual Transmission of Ebola Virus. *N Engl J Med.* 2015. doi: 10.1056/NEJMoa1509773. PubMed PMID: 26465384.
122. Geisbert T. W. Persistence of Ebola virus RNA in seminal fluid. *Lancet Glob Health.* 2017;5(1):e12-e3. Epub 2016/12/14. doi: 10.1016/s2214-109x(16)30336-9. PubMed PMID: 27955770.

123. Diallo B., Sissoko D., Loman N. J., Bah H. A., Bah H., Worrell M. C., et al. Resurgence of Ebola Virus Disease in Guinea Linked to a Survivor With Virus Persistence in Seminal Fluid for More Than 500 Days. *Clin Infect Dis.* 2016;63(10):1353-6. Epub 2016/10/30. doi: 10.1093/cid/ciw601. PubMed PMID: 27585800; PubMed Central PMCID: PMC5091350.
124. Subissi L., Keita M., Mesfin S., Rezza G., Diallo B., Van Gucht S., et al. Ebola Virus Transmission Caused by Persistently Infected Survivors of the 2014-2016 Outbreak in West Africa. *J Infect Dis.* 2018;218(suppl_5):S287-s91. Epub 2018/06/20. doi: 10.1093/infdis/jiy280. PubMed PMID: 29920602; PubMed Central PMCID: PMC56249578.
125. Jacobs M., Rodger A., Bell D. J., Bhagani S., Cropley I., Filipe A., et al. Late Ebola virus relapse causing meningoencephalitis: a case report. *Lancet.* 2016;388(10043):498-503. Epub 2016/05/23. doi: 10.1016/s0140-6736(16)30386-5. PubMed PMID: 27209148; PubMed Central PMCID: PMC4967715.
126. MacIntyre C. R., Chughtai A. A. Recurrence and reinfection--a new paradigm for the management of Ebola virus disease. *Int J Infect Dis.* 2016;43:58-61. Epub 2015/12/30. doi: 10.1016/j.ijid.2015.12.011. PubMed PMID: 26711624.
127. Rodriguez L. L., De Roo A., Guimard Y., Trappier S. G., Sanchez A., Bressler D., et al. Persistence and genetic stability of Ebola virus during the outbreak in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J Infect Dis.* 1999;179 Suppl 1:S170-6. Epub 1999/02/13. doi: 10.1086/514291. PubMed PMID: 9988181.
128. Schountz T., Prescott J. Hantavirus immunology of rodent reservoirs: current status and future directions. *Viruses.* 2014;6(3):1317-35. Epub 2014/03/19. doi: 10.3390/v6031317. PubMed PMID: 24638205; PubMed Central PMCID: PMC3970152.
129. Schountz T., Acuña-Retamar M., Feinstein S., Prescott J., Torres-Perez F., Podell B., et al. Kinetics of immune responses in deer mice experimentally infected with Sin Nombre virus. *J Virol.* 2012;86(18):10015-27. Epub 2012/07/11. doi: 10.1128/JVI.06875-11. PubMed PMID: 22787210.
130. Yanagihara R., Amyx H. L., Gajdusek D. C. Experimental infection with Puumala virus, the etiologic agent of nephropathia epidemica, in bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *J Virol.* 1985;55(1):34-8. PubMed PMID: 2861296.
131. Ermonval M., Baychelier F., Tordo N. What Do We Know about How Hantaviruses Interact with Their Different Hosts? *Viruses.* 2016;8(8):223. doi: 10.3390/v8080223. PubMed PMID: 27529272.
132. Fenton M. B. and Simmons, N. B. *Bats: A World of Science and Mystery.* Chicago, USA: University of Chicago Press; 2015. 240 p.
133. Teeling E., Vernes S., Davalos L., Ray D., Gilbert M., Myers E., et al. Bat Biology, Genomes, and the Bat1K Project: To Generate Chromosome-Level Genomes for All Living Bat Species. *Annual Review of Animal Biosciences.* 2018;6. doi: 10.1146/annurev-animal-022516-022811.

134. American Society of Mammalogists. Mammal Diversity Database 2020 [updated 2020-04-02]. Available from: <https://mammaldiversity.org>.
135. Jones K., Bininda-Emonds O., Gittleman J. L. Bats, clocks, and rocks: Diversification patterns in chiroptera. *Evolution*. 2005;59:2243-55. doi: 10.1111/j.0014-3820.2005.tb00932.x.
136. Neuweiler G. *The Biology of Bats*. New York: Oxford University Press; 2000.
137. Teeling E. C., Madsen O., Van Den Bussche R. A., de Jong W. W., Stanhope M. J., Springer M. S. Microbat paraphyly and the convergent evolution of a key innovation in Old World rhinolophoid microbats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(3):1431-6. doi: 10.1073/pnas.022477199.
138. Integrated Taxonomic Information System on-line database 2020 [02/04/2020]. Available from: <http://www.itis.gov>.
139. Maganga G. D., Bourgarel M., Vallo P., Dallo T. D., Ngoagouni C., Drexler J. F., et al. Bat distribution size or shape as determinant of viral richness in african bats. *PLoS One*. 2014;9(6):e100172. doi: 10.1371/journal.pone.0100172. PubMed PMID: 24959855; PubMed Central PMCID: PMC4069033.
140. Jetz W., McPherson J. M., Guralnick R. P. Integrating biodiversity distribution knowledge: toward a global map of life. *Trends Ecol Evol*. 2012;27(3):151-9. Epub 2011/10/25. doi: 10.1016/j.tree.2011.09.007. PubMed PMID: 22019413.
141. Monadjem A., Cotterill, F., Hutson, A.M., Mickleburgh, S. and Bergmans, W. *Mops condylurus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2017 2017 [03 April 2020]. Available from: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-2.RLTS.T13838A22075340.en>.
142. Roxburgh L., Raimondo D., Page-Nicholson S., Relton C. *The Red List of Mammals of South Africa, Swaziland and Lesotho*. South African National Biodiversity Institute and Endangered Wildlife Trust, South Africa, 2016.
143. Monadjem A. Taylor P.J., Cotterill F.P.D., Schoeman M.C. *Bats Of Southern And Central Africa - A Biogeographic And Taxonomic Synthesis*. Johannesburg: Wits University Press; 2010.
144. Bohmann K., Monadjem A., Lehmkuhl Noer C., Rasmussen M., Zeale M. R., Clare E., et al. Molecular diet analysis of two african free-tailed bats (molossidae) using high throughput sequencing. *PLoS One*. 2011;6(6):e21441. doi: 10.1371/journal.pone.0021441. PubMed PMID: 21731749; PubMed Central PMCID: PMC3120876.
145. Happold D. C., Happold M. Reproduction of Angola free-tailed bats (*Tadarida condylura*) and little free-tailed bats (*Tadarida pumila*) in Malawi (Central Africa) and elsewhere in Africa. *J Reprod Fertil*. 1989;85(1):133-49. Epub 1989/01/01. doi: 10.1530/jrf.0.0850133. PubMed PMID: 2915350.
146. Vivier L., van der Merwe, M. Reproduction in the female Angolan free-tailed bat, *Tadarida (Mops) condylura* (Microchiroptera: Molossidae), in the eastern Transvaal, South Africa *J Zool*. 2009.

147. Han H. J., Wen H. L., Zhou C. M., Chen F. F., Luo L. M., Liu J. W., et al. Bats as reservoirs of severe emerging infectious diseases. *Virus Res.* 2015;205:1-6. doi: 10.1016/j.virusres.2015.05.006. PubMed PMID: 25997928.
148. Smith I., Wang L. F. Bats and their virome: an important source of emerging viruses capable of infecting humans. *Curr Opin Virol.* 2013;3(1):84-91. doi: 10.1016/j.coviro.2012.11.006. PubMed PMID: 23265969.
149. Mandl J. N., Schneider C., Schneider D. S., Baker M. L. Going to Bat(s) for Studies of Disease Tolerance. *Front Immunol.* 2018;9:2112-. doi: 10.3389/fimmu.2018.02112. PubMed PMID: 30294323.
150. THOMAS S. P., SUTHERS R. A. The Physiology and Energetics of Bat Flight. *J Exp Biol.* 1972;57(2):317-35.
151. Austad S. N. Methusaleh's Zoo: how nature provides us with clues for extending human health span. *J Comp Pathol.* 2010;142 Suppl 1(Suppl 1):S10-S21. Epub 2009/12/04. doi: 10.1016/j.jcpa.2009.10.024. PubMed PMID: 19962715.
152. Calisher C. H., Childs J. E., Field H. E., Holmes K. V., Schountz T. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(3):531-45. doi: 10.1128/CMR.00017-06. PubMed PMID: 16847084; PubMed Central PMCID: PMC1539106.
153. Wang L. F. and Cowled, C. Bats and Viruses - A New Frontier of Emerging Infectious Diseases. New Jersey, USA: John Wiley & Sons; 2015. 384 p.
154. Podlutzky A. J., Khritankov A. M., Ovodov N. D., Austad S. N. A new field record for bat longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2005;60(11):1366-8. Epub 2005/12/13. doi: 10.1093/gerona/60.11.1366. PubMed PMID: 16339320.
155. Fleischer T., Gampe J., Scheuerlein A., Kerth G. Rare catastrophic events drive population dynamics in a bat species with negligible senescence. *Sci Rep.* 2017;7(1):7370. Epub 2017/08/06. doi: 10.1038/s41598-017-06392-9. PubMed PMID: 28779071; PubMed Central PMCID: PMCPMC5544728.
156. Wang L. F., Walker P. J., Poon L. L. Mass extinctions, biodiversity and mitochondrial function: are bats 'special' as reservoirs for emerging viruses? *Curr Opin Virol.* 2011;1(6):649-57. doi: 10.1016/j.coviro.2011.10.013. PubMed PMID: 22440923.
157. Baker M. L., Schountz T., Wang L. F. Antiviral immune responses of bats: a review. *Zoonoses Public Health.* 2013;60(1):104-16. doi: 10.1111/j.1863-2378.2012.01528.x. PubMed PMID: 23302292.
158. Jones M. E. B., Amman B. R., Sealy T. K., Uebelhoer L. S., Schuh A. J., Flietstra T., et al. Clinical, Histopathologic, and Immunohistochemical Characterization of Experimental Marburg Virus Infection in A Natural Reservoir Host, the Egyptian Rousette Bat (*Rousettus aegyptiacus*). *Viruses.* 2019;11(3):214. doi: 10.3390/v11030214. PubMed PMID: 30832364.

159. Schneider D. S., Ayres J. S. Two ways to survive infection: what resistance and tolerance can teach us about treating infectious diseases. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(11):889-95. doi: 10.1038/nri2432. PubMed PMID: 18927577.
160. Ayres J. S., Schneider D. S. Tolerance of infections. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:271-94. Epub 2012/01/10. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075030. PubMed PMID: 22224770.
161. Pavlovich S. S., Lovett S. P., Koroleva G., Guito J. C., Arnold C. E., Nagle E. R., et al. The Egyptian Rousette Genome Reveals Unexpected Features of Bat Antiviral Immunity. *Cell*. 2018;173(5):1098-110.e18. Epub 2018/05/01. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.070. PubMed PMID: 29706541; PubMed Central PMCID: PMC57112298.
162. Zhou P., Cowled C., Todd S., Crameri G., Virtue E. R., Marsh G. A., et al. Type III IFNs in pteropid bats: differential expression patterns provide evidence for distinct roles in antiviral immunity. *J Immunol*. 2011;186(5):3138-47. doi: 10.4049/jimmunol.1003115. PubMed PMID: 21278349; PubMed Central PMCID: PMC3057921.
163. Virtue E. R., Marsh G. A., Baker M. L., Wang L. F. Interferon production and signaling pathways are antagonized during henipavirus infection of fruit bat cell lines. *PLoS One*. 2011;6(7):e22488. Epub 2011/08/04. doi: 10.1371/journal.pone.0022488. PubMed PMID: 21811620; PubMed Central PMCID: PMC3139658.
164. Zhou P., Cowled C., Mansell A., Monaghan P., Green D., Wu L., et al. IRF7 in the Australian black flying fox, *Pteropus alecto*: evidence for a unique expression pattern and functional conservation. *PLoS One*. 2014;9(8):e103875-e. doi: 10.1371/journal.pone.0103875. PubMed PMID: 25100081.
165. Zhou P., Tachedjian M., Wynne J. W., Boyd V., Cui J., Smith I., et al. Contraction of the type I IFN locus and unusual constitutive expression of IFN- α in bats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(10):2696-701. Epub 2016/02/24. doi: 10.1073/pnas.1518240113. PubMed PMID: 26903655; PubMed Central PMCID: PMC4790985.
166. De La Cruz-Rivera P. C., Kanchwala M., Liang H., Kumar A., Wang L. F., Xing C., et al. The IFN Response in Bats Displays Distinctive IFN-Stimulated Gene Expression Kinetics with Atypical RNASEL Induction. *J Immunol*. 2018;200(1):209-17. Epub 2017/11/29. doi: 10.4049/jimmunol.1701214. PubMed PMID: 29180486; PubMed Central PMCID: PMC5736455.
167. Wehner R. and Gehring, W. *Zoologie*. Stuttgart: Thieme; 1995.
168. Schmidt R.F. and Thews, G. *Physiologie des Menschen*. Berlin: Springer; 2000.
169. Paul R. J. *Physiologie der Tiere*. Stuttgart: Thieme; 2001.
170. Herreid C. F., 2nd. Metabolism of the Mexican free-tailed bat. *J Cell Comp Physiol*. 1963;61:201-7. PubMed PMID: 13954052.
171. Czenze Z., Dunbar M. Hot bats go cold: Heterothermy in neotropical bats. *Can J Zool*. 2017;95. doi: 10.1139/cjz-2016-0318.

172. Vivier L., van der Merwe M. The incidence of torpor in winter and summer in the Angolan free-tailed bat, *Mops condylurus* (Microchiroptera: Molossidae), in a subtropical environment, Mpumalanga, South Africa. *Afr Zool.* 2007;42(1):50-8. doi: 10.1080/15627020.2007.11407377.
173. Maloney S. K., Bronner G. N., Buffenstein R. Thermoregulation in the Angolan free-tailed bat *Mops condylurus*: A small mammal that uses hot roosts. *Physiol Biochem Zool.* 1999;72(4):385-96. Epub 1999/08/11. doi: 10.1086/316677. PubMed PMID: 10438676.
174. George D. B., Webb C. T., Farnsworth M. L., O'Shea T. J., Bowen R. A., Smith D. L., et al. Host and viral ecology determine bat rabies seasonality and maintenance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(25):10208-13. doi: 10.1073/pnas.1010875108. PubMed PMID: 21646516; PubMed Central PMCID: PMC3121824.
175. Bronner G. N., Maloney S. K., Buffenstein R. Survival tactics within thermally-challenging roosts: heat tolerance and cold sensitivity in the Angolan free-tailed bat, *Mops condylurus*. *S Afr J Zool.* 1999;34(1):1-10. doi: 10.1080/02541858.1999.11448481.
176. O'Shea T. J., Cryan P. M., Cunningham A. A., Fooks A. R., Hayman D. T., Luis A. D., et al. Bat flight and zoonotic viruses. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(5):741-5. doi: 10.3201/eid2005.130539. PubMed PMID: 24750692; PubMed Central PMCID: PMC4012789.
177. wetter-atlas.de. Klima und Wetter in der Elfenbeinküste. Available from: <https://www.wetter-atlas.de/klima/afrika/elfenbeinkueste.php>.
178. Klima.org. Klima Elfenbeinküste. Available from: <https://klima.org/elfenbeink%C3%BCste/>.
179. wetter.com. Klimadiagramme und Klimatabellen - Abidjan. Available from: <https://www.wetter.com/elfenbeinkueste/AFCI.html>.
180. Ng M., Ndungo E., Kaczmarek M. E., Herbert A. S., Binger T., Kuehne A. I., et al. Filovirus receptor NPC1 contributes to species-specific patterns of ebolavirus susceptibility in bats. *Elife.* 2015;4. Epub 2015/12/25. doi: 10.7554/eLife.11785. PubMed PMID: 26698106.
181. Kondoh T., Letko M., Munster V. J., Manzoor R., Maruyama J., Furuyama W., et al. Single-Nucleotide Polymorphisms in Human NPC1 Influence Filovirus Entry Into Cells. *J Infect Dis.* 2018. Epub 2018/07/17. doi: 10.1093/infdis/jiy248. PubMed PMID: 30010949.
182. Takadate Y., Kondoh T., Igarashi M., Maruyama J., Manzoor R., Ogawa H., et al. Niemann-Pick C1 Heterogeneity of Bat Cells Controls Filovirus Tropism. *Cell Rep.* 2020;30(2):308-19.e5. Epub 2020/01/16. doi: 10.1016/j.celrep.2019.12.042. PubMed PMID: 31940478.
183. Haydon D. T., Cleaveland S., Taylor L. H., Laurenson M. K. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(12):1468-73. doi: 10.3201/eid0812.010317. PubMed PMID: 12498665.

184. Jones K. E., Patel N. G., Levy M. A., Storeygard A., Balk D., Gittleman J. L., et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*. 2008;451(7181):990-3. Epub 2008/02/22. doi: 10.1038/nature06536. PubMed PMID: 18288193; PubMed Central PMCID: PMCPMC5960580.
185. Olival K. J., Hosseini P. R., Zambrana-Torrel C., Ross N., Bogich T. L., Daszak P. Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals. *Nature*. 2017;advance online publication. doi: 10.1038/nature22975 <http://www.nature.com/nature/journal/vaop/ncurrent/abs/nature22975.html#supplementary-information>.
186. Plourde B. T., Burgess T. L., Eskew E. A., Roth T. M., Stephenson N., Foley J. E. Are disease reservoirs special? Taxonomic and life history characteristics. *PLoS One*. 2017;12(7):e0180716-e. doi: 10.1371/journal.pone.0180716. PubMed PMID: 28704402.
187. Luis A. D., Hayman D. T., O'Shea T. J., Cryan P. M., Gilbert A. T., Pulliam J. R., et al. A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? *Proc Biol Sci*. 2013;280(1756):20122753. doi: 10.1098/rspb.2012.2753. PubMed PMID: 23378666; PubMed Central PMCID: PMC3574368.
188. Halpin K., Hyatt A. D., Fogarty R., Middleton D., Bingham J., Epstein J. H., et al. Pteropid bats are confirmed as the reservoir hosts of henipaviruses: a comprehensive experimental study of virus transmission. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2011;85(5):946-51. doi: 10.4269/ajtmh.2011.10-0567. PubMed PMID: 22049055.
189. Amman B. R., Jones M. E., Sealy T. K., Uebelhoer L. S., Schuh A. J., Bird B. H., et al. Oral shedding of marburg virus in experimentally infected Egyptian fruit bats (*Rousettus aegyptiacus*). *J Wildl Dis*. 2015;51(1):113-24. doi: 10.7589/2014-08-198. PubMed PMID: 25375951.
190. Wang L. F., Anderson D. E. Viruses in bats and potential spillover to animals and humans. *Curr Opin Virol*. 2019;34:79-89. Epub 2019/01/22. doi: 10.1016/j.coviro.2018.12.007. PubMed PMID: 30665189; PubMed Central PMCID: PMCPMC7102861.
191. Swanepoel R., Leman P. A., Burt F. J., Zachariades N. A., Braack L. E., Ksiazek T. G., et al. Experimental inoculation of plants and animals with Ebola virus. *Emerg Infect Dis*. 1996;2(4):321-5. doi: 10.3201/eid0204.960407. PubMed PMID: 8969248; PubMed Central PMCID: PMC2639914.
192. Williamson M. M., Hooper P. T., Selleck P. W., Gleeson L. J., Daniels P. W., Westbury H. A., et al. Transmission studies of Hendra virus (equine morbillivirus) in fruit bats, horses and cats. *Aust Vet J*. 1998;76(12):813-8. Epub 1999/02/11. doi: 10.1111/j.1751-0813.1998.tb12335.x. PubMed PMID: 9972433.
193. Middleton D. J., Morrissy C. J., van der Heide B. M., Russell G. M., Braun M. A., Westbury H. A., et al. Experimental Nipah virus infection in pteropid bats (*Pteropus poliocephalus*). *J Comp Pathol*. 2007;136(4):266-72. Epub 2007/05/15. doi: 10.1016/j.jcpa.2007.03.002. PubMed PMID: 17498518.

194. Bean A. G. D., Baker M. L., Stewart C. R., Cowled C., Deffrasnes C., Wang L. F., et al. Studying immunity to zoonotic diseases in the natural host - keeping it real. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(12):851-61. Epub 2013/10/25. doi: 10.1038/nri3551. PubMed PMID: 24157573.
195. Mandl J. N., Ahmed R., Barreiro L. B., Daszak P., Epstein J. H., Virgin H. W., et al. Reservoir host immune responses to emerging zoonotic viruses. *Cell*. 2015;160(1-2):20-35. doi: 10.1016/j.cell.2014.12.003. PubMed PMID: 25533784; PubMed Central PMCID: PMC4390999.
196. Drexler J. F., Corman V. M., Muller M. A., Maganga G. D., Vallo P., Binger T., et al. Bats host major mammalian paramyxoviruses. *Nat Commun*. 2012;3:796. doi: 10.1038/ncomms1796. PubMed PMID: 22531181; PubMed Central PMCID: PMC3343228.
197. Hallmaier-Wacker L. K., Munster V. J., Knauf S. Disease reservoirs: from conceptual frameworks to applicable criteria. *Emerging Microbes & Infections*. 2017;6(1):1-5. doi: 10.1038/emi.2017.65.
198. Sohayati A. R., Hassan L., Sharifah S. H., Lazarus K., Zaini C. M., Epstein J. H., et al. Evidence for Nipah virus recrudescence and serological patterns of captive *Pteropus vampyrus*. *Epidemiol Infect*. 2011;139(10):1570-9. Epub 2011/04/28. doi: 10.1017/S0950268811000550. PubMed PMID: 21524339.
199. Schuh A. J., Amman B. R., Jones M. E. B., Sealy T. K., Uebelhoer L. S., Spengler J. R., et al. Modelling filovirus maintenance in nature by experimental transmission of Marburg virus between Egyptian rousette bats. *Nature Communications*. 2017;8(1):14446. doi: 10.1038/ncomms14446.
200. Subudhi S., Rapin N., Misra V. Immune System Modulation and Viral Persistence in Bats: Understanding Viral Spillover. *Viruses*. 2019;11(2):192. doi: 10.3390/v11020192. PubMed PMID: 30813403.
201. Plowright R. K., Peel A. J., Streicker D. G., Gilbert A. T., McCallum H., Wood J., et al. Transmission or Within-Host Dynamics Driving Pulses of Zoonotic Viruses in Reservoir-Host Populations. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(8):e0004796. Epub 2016/08/05. doi: 10.1371/journal.pntd.0004796. PubMed PMID: 27489944; PubMed Central PMCID: PMC4973921.
202. Plowright R. K., Eby P., Hudson P. J., Smith I. L., Westcott D., Bryden W. L., et al. Ecological dynamics of emerging bat virus spillover. *Proc Biol Sci*. 2015;282(1798):20142124. doi: 10.1098/rspb.2014.2124. PubMed PMID: 25392474; PubMed Central PMCID: PMC4262174.
203. Plowright R. K., Field H. E., Smith C., Divljan A., Palmer C., Tabor G., et al. Reproduction and nutritional stress are risk factors for Hendra virus infection in little red flying foxes (*Pteropus scapulatus*). *Proc Biol Sci*. 2008;275(1636):861-9. doi: 10.1098/rspb.2007.1260. PubMed PMID: 18198149; PubMed Central PMCID: PMC2596896.

204. Pourrut X., Delicat A., Rollin P. E., Ksiazek T. G., Gonzalez J. P., Leroy E. M. Spatial and temporal patterns of Zaire ebolavirus antibody prevalence in the possible reservoir bat species. *J Infect Dis.* 2007;196 Suppl 2:S176-83. doi: 10.1086/520541. PubMed PMID: 17940947.
205. Amman B. R., Carroll S. A., Reed Z. D., Sealy T. K., Balinandi S., Swanepoel R., et al. Seasonal pulses of Marburg virus circulation in juvenile *Rousettus aegyptiacus* bats coincide with periods of increased risk of human infection. *PLoS Pathog.* 2012;8(10):e1002877. doi: 10.1371/journal.ppat.1002877. PubMed PMID: 23055920; PubMed Central PMCID: PMC3464226.
206. Field H., McCall B., Barrett J. Australian bat lyssavirus infection in a captive juvenile black flying fox. *Emerg Infect Dis.* 1999;5(3):438-40. doi: 10.3201/eid0503.990316. PubMed PMID: 10341182.
207. McColl K. A., Chamberlain T., Lunt R. A., Newberry K. M., Middleton D., Westbury H. A. Pathogenesis studies with Australian bat lyssavirus in grey-headed flying foxes (*Pteropus poliocephalus*). *Aust Vet J.* 2002;80(10):636-41. Epub 2002/12/06. doi: 10.1111/j.1751-0813.2002.tb10973.x. PubMed PMID: 12465817.
208. Turmelle A. S., Jackson F. R., Green D., McCracken G. F., Rupprecht C. E. Host immunity to repeated rabies virus infection in big brown bats. *The Journal of general virology.* 2010;91(Pt 9):2360-6. Epub 2010/06/02. doi: 10.1099/vir.0.020073-0. PubMed PMID: 20519458.
209. Johnson N., Vos A., Neubert L., Freuling C., Mansfield K. L., Kaipf I., et al. Experimental study of European bat lyssavirus type-2 infection in Daubenton's bats (*Myotis daubentonii*). *J Gen Virol.* 2008;89(Pt 11):2662-72. doi: 10.1099/vir.0.2008/003889-0. PubMed PMID: 18931061.
210. Freuling C., Vos A., Johnson N., Kaipf I., Denzinger A., Neubert L., et al. Experimental infection of serotine bats (*Eptesicus serotinus*) with European bat lyssavirus type 1a. *J Gen Virol.* 2009;90(Pt 10):2493-502. doi: 10.1099/vir.0.011510-0. PubMed PMID: 19515825.
211. Fisher C. R., Streicker D. G., Schnell M. J. The spread and evolution of rabies virus: conquering new frontiers. *Nature reviews Microbiology.* 2018;16(4):241-55. Epub 2018/02/26. doi: 10.1038/nrmicro.2018.11. PubMed PMID: 29479072.
212. Fooks A. R., Banyard A. C., Horton D. L., Johnson N., McElhinney L. M., Jackson A. C. Current status of rabies and prospects for elimination. *Lancet.* 2014;384(9951):1389-99. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62707-5. PubMed PMID: 24828901.
213. Colombi D., Serra-Cobo J., Métras R., Apolloni A., Poletto C., López-Roig M., et al. Mechanisms for lyssavirus persistence in non-synanthropic bats in Europe: insights from a modeling study. *Sci Rep.* 2019;9(1):537. doi: 10.1038/s41598-018-36485-y.
214. Blackwood J. C., Streicker D. G., Altizer S., Rohani P. Resolving the roles of immunity, pathogenesis, and immigration for rabies persistence in vampire bats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(51):20837-42. Epub 2013/12/02. doi: 10.1073/pnas.1308817110. PubMed PMID: 24297874.

215. Halpin K., Young P. L., Field H. E., Mackenzie J. S. Isolation of Hendra virus from pteropid bats: a natural reservoir of Hendra virus. *J Gen Virol.* 2000;81(Pt 8):1927-32. Epub 2000/07/19. doi: 10.1099/0022-1317-81-8-1927. PubMed PMID: 10900029.
216. Chua K. B., Koh C. L., Hooi P. S., Wee K. F., Khong J. H., Chua B. H., et al. Isolation of Nipah virus from Malaysian Island flying-foxes. *Microbes Infect.* 2002;4(2):145-51. Epub 2002/03/07. doi: 10.1016/s1286-4579(01)01522-2. PubMed PMID: 11880045.
217. Lau S. K., Woo P. C., Li K. S., Huang Y., Tsoi H. W., Wong B. H., et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(39):14040-5. Epub 2005/09/20. doi: 10.1073/pnas.0506735102. PubMed PMID: 16169905; PubMed Central PMCID: PMC1236580.
218. Li W., Shi Z., Yu M., Ren W., Smith C., Epstein J. H., et al. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science.* 2005;310(5748):676-9. Epub 2005/10/01. doi: 10.1126/science.1118391. PubMed PMID: 16195424.
219. Ge X. Y., Li J. L., Yang X. L., Chmura A. A., Zhu G., Epstein J. H., et al. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature.* 2013;503(7477):535-8. Epub 2013/11/01. doi: 10.1038/nature12711. PubMed PMID: 24172901; PubMed Central PMCID: PMC389864.
220. Lau S. K. P., Wong A. C. P., Lau T. C. K., Woo P. C. Y. Molecular Evolution of MERS Coronavirus: Dromedaries as a Recent Intermediate Host or Long-Time Animal Reservoir? *Int J Mol Sci.* 2017;18(10):2138. doi: 10.3390/ijms18102138. PubMed PMID: 29035289.
221. Paden C. R., Yusof Mfbm, Al Hammadi Z. M., Queen K., Tao Y., Eltahir Y. M., et al. Zoonotic origin and transmission of Middle East respiratory syndrome coronavirus in the UAE. *Zoonoses Public Health.* 2018;65(3):322-33. Epub 2017/12/15. doi: 10.1111/zph.12435. PubMed PMID: 29239118; PubMed Central PMCID: PMC5893383.
222. Killerby M. E., Biggs H. M., Midgley C. M., Gerber S. I., Watson J. T. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Transmission. *Emerging Infectious Disease journal.* 2020;26(2):191. doi: 10.3201/eid2602.190697.
223. Wernery U., Lau S. K. P., Woo P. C. Y. Middle East respiratory syndrome (MERS) coronavirus and dromedaries. *Veterinary journal (London, England : 1997).* 2017;220:75-9. Epub 2017/01/09. doi: 10.1016/j.tvjl.2016.12.020. PubMed PMID: 28190501.
224. Corman V. M., Ithete N. L., Richards L. R., Schoeman M. C., Preiser W., Drosten C., et al. Rooting the Phylogenetic Tree of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus by Characterization of a Conspecific Virus from an African Bat. *J Virol.* 2014;88(19):11297-303. doi: 10.1128/jvi.01498-14.
225. Hu B., Ge X., Wang L. F., Shi Z. Bat origin of human coronaviruses. *Virol J.* 2015;12:221-. doi: 10.1186/s12985-015-0422-1. PubMed PMID: 26689940.

226. Guo Y.-R., Cao Q.-D., Hong Z.-S., Tan Y.-Y., Chen S.-D., Jin H.-J., et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status. *Military Medical Research*. 2020;7(1):11-. doi: 10.1186/s40779-020-00240-0. PubMed PMID: 32169119.
227. Johns Hopkins University - Coronavirus Resource Center. Coronavirus COVID-19 Global Cases by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University (JHU) 2020. Available from: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>.
228. Zhou P., Yang X.-L., Wang X.-G., Hu B., Zhang L., Zhang W., et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579(7798):270-3. Epub 2020/02/03. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7. PubMed PMID: 32015507.
229. Zheng J. SARS-CoV-2: an Emerging Coronavirus that Causes a Global Threat. *Int J Biol Sci*. 2020;16(10):1678-85. Epub 2020/04/01. doi: 10.7150/ijbs.45053. PubMed PMID: 32226285; PubMed Central PMCID: PMC7098030.
230. Wu F., Zhao S., Yu B., Chen Y.-M., Wang W., Song Z.-G., et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020;579(7798):265-9. doi: 10.1038/s41586-020-2008-3.
231. Subudhi S., Rapin N., Bollinger T. K., Hill J. E., Donaldson M. E., Davy C. M., et al. A persistently infecting coronavirus in hibernating *Myotis lucifugus*, the North American little brown bat. *The Journal of general virology*. 2017;98(9):2297-309. Epub 2017/08/25. doi: 10.1099/jgv.0.000898. PubMed PMID: 28840816.
232. Guo W.-P., Lin X.-D., Wang W., Tian J.-H., Cong M.-L., Zhang H.-L., et al. Phylogeny and origins of hantaviruses harbored by bats, insectivores, and rodents. *PLoS Pathog*. 2013;9(2):e1003159-e. Epub 2013/02/07. doi: 10.1371/journal.ppat.1003159. PubMed PMID: 23408889.
233. de Araujo J., Thomazelli L. M., Henriques D. A., Lautenschlager D., Ometto T., Dutra L. M., et al. Detection of hantavirus in bats from remaining rain forest in São Paulo, Brazil. *BMC Res Notes*. 2012;5(1):690. doi: 10.1186/1756-0500-5-690.
234. Sabino-Santos Jr G., Maia F. G. M., Martins R. B., Gagliardi T. B., Souza W. M., Muylaert R. L., et al. Natural infection of Neotropical bats with hantavirus in Brazil. *Sci Rep*. 2018;8(1):9018. doi: 10.1038/s41598-018-27442-w.
235. Kim G. R., Lee Y. T., Park C. H. A new natural reservoir of hantavirus: isolation of hantaviruses from lung tissues of bats. *Arch Virol*. 1994;134(1-2):85-95. Epub 1994/01/01. doi: 10.1007/bf01379109. PubMed PMID: 8279962.
236. Weiss S., Witkowski P. T., Auste B., Nowak K., Weber N., Fahr J., et al. Hantavirus in bat, Sierra Leone. *Emerg Infect Dis*. 2012;18(1):159-61. Epub 2012/01/21. doi: 10.3201/eid1801.111026. PubMed PMID: 22261176; PubMed Central PMCID: PMC3310113.
237. Clement J., Ahlm C., Avšič-Županc T., Botten J., Chandran K., Jonsson C. B., et al. Meeting report: Eleventh International Conference on Hantaviruses. *Antiviral Res*. 2020;176:104733. doi: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104733>.

238. Towner J. S., Amman B. R., Sealy T. K., Carroll S. A., Comer J. A., Kemp A., et al. Isolation of genetically diverse Marburg viruses from Egyptian fruit bats. *PLoS Pathog.* 2009;5(7):e1000536. doi: 10.1371/journal.ppat.1000536. PubMed PMID: 19649327; PubMed Central PMCID: PMC2713404.
239. Paweska J. T., Jansen van Vuren P., Masumu J., Leman P. A., Grobbelaar A. A., Birkhead M., et al. Virological and serological findings in *Rousettus aegyptiacus* experimentally inoculated with vero cells-adapted hogan strain of Marburg virus. *PLoS One.* 2012;7(9):e45479. doi: 10.1371/journal.pone.0045479. PubMed PMID: 23029039; PubMed Central PMCID: PMC3444458.
240. Towner J. S., Pourrut X., Albarino C. G., Nkogue C. N., Bird B. H., Grard G., et al. Marburg virus infection detected in a common African bat. *PLoS One.* 2007;2(8):e764. doi: 10.1371/journal.pone.0000764. PubMed PMID: 17712412; PubMed Central PMCID: PMC1942080.
241. Schuh A. J., Amman B. R., Towner J. S. Filoviruses and bats. *Microbiol Aust.* 2017;38(1):12-6. Epub 2017/06/13. doi: 10.1071/ma17005. PubMed PMID: 28603449; PubMed Central PMCID: PMCPMC5460772.
242. Pigott D. M., Golding N., Mylne A., Huang Z., Weiss D. J., Brady O. J., et al. Mapping the zoonotic niche of Marburg virus disease in Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2015;109(6):366-78. doi: 10.1093/trstmh/trv024. PubMed PMID: 25820266; PubMed Central PMCID: PMC4447827.
243. Amman B. R., Nyakarahuka L., McElroy A. K., Dodd K. A., Sealy T. K., Schuh A. J., et al. Marburgvirus resurgence in Kitaka Mine bat population after extermination attempts, Uganda. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(10):1761-4. doi: 10.3201/eid2010.140696. PubMed PMID: 25272104; PubMed Central PMCID: PMC4193183.
244. Amman B. R., Bird B. H., Bakarr I. A., Bangura J., Schuh A. J., Johnny J., et al. Isolation of Angola-like Marburg virus from Egyptian rousette bats from West Africa. *Nature Communications.* 2020;11(1):510. doi: 10.1038/s41467-020-14327-8.
245. Pigott D. M., Golding N., Mylne A., Huang Z., Henry A. J., Weiss D. J., et al. Mapping the zoonotic niche of Ebola virus disease in Africa. *Elife.* 2014;3:e04395. doi: 10.7554/eLife.04395. PubMed PMID: 25201877; PubMed Central PMCID: PMC4166725.
246. Groseth A., Feldmann H., Strong J. E. The ecology of Ebola virus. *Trends Microbiol.* 2007;15(9):408-16. Epub 2007/08/19. doi: 10.1016/j.tim.2007.08.001. PubMed PMID: 17698361.
247. Olson S. H., Reed P., Cameron K. N., Ssebide B. J., Johnson C. K., Morse S. S., et al. Dead or alive: animal sampling during Ebola hemorrhagic fever outbreaks in humans. *Emerg Health Threats J.* 2012;5. doi: 10.3402/ehth.v5i0.9134. PubMed PMID: 22558004; PubMed Central PMCID: PMC3342678.
248. Anti P., Owusu M., Agbenyega O., Annan A., Badu E. K., Nkrumah E. E., et al. Human-Bat Interactions in Rural West Africa. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(8):1418-21. Epub 2015/07/16. doi: 10.3201/eid2108.142015. PubMed PMID: 26177344; PubMed Central PMCID: PMCPMC4517717.

249. Leroy E. M., Epelboin A., Mondonge V., Pourrut X., Gonzalez J. P., Muyembe-Tamfum J. J., et al. Human Ebola outbreak resulting from direct exposure to fruit bats in Luebo, Democratic Republic of Congo, 2007. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2009;9(6):723-8. doi: 10.1089/vbz.2008.0167. PubMed PMID: 19323614.
250. Mari Saez A., Weiss S., Nowak K., Lapeyre V., Zimmermann F., Dux A., et al. Investigating the zoonotic origin of the West African Ebola epidemic. *EMBO Mol Med.* 2015;7(1):17-23. doi: 10.15252/emmm.201404792. PubMed PMID: 25550396; PubMed Central PMCID: PMC4309665.
251. Arata A. A. , Johnson B. APPROACHES TOWARDS STUDIES ON POTENTIAL RESERVOIRS OF VIRAL HAEMORRHAGIC FEVER IN SOUTHERN SUDAN (1977): Elsevier/Netherland Biomedical; 1978.
252. Jones M. E., Schuh A. J., Amman B. R., Sealy T. K., Zaki S. R., Nichol S. T., et al. Experimental Inoculation of Egyptian Rousette Bats (*Rousettus aegyptiacus*) with Viruses of the Ebolavirus and Marburgvirus Genera. *Viruses.* 2015;7(7):3420-42. doi: 10.3390/v7072779. PubMed PMID: 26120867.
253. Paweska J. T., Storm N., Grobbelaar A. A., Markotter W., Kemp A., Jansen van Vuren P. Experimental Inoculation of Egyptian Fruit Bats (*Rousettus aegyptiacus*) with Ebola Virus. *Viruses.* 2016;8(2). Epub 2016/01/26. doi: 10.3390/v8020029. PubMed PMID: 26805873.
254. Leroy E. M., Kumulungui B., Pourrut X., Rouquet P., Hassanin A., Yaba P., et al. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature.* 2005;438(7068):575-6. doi: 10.1038/438575a. PubMed PMID: 16319873.
255. Pourrut X., Souris M., Towner J. S., Rollin P. E., Nichol S. T., Gonzalez J. P., et al. Large serological survey showing cocirculation of Ebola and Marburg viruses in Gabonese bat populations, and a high seroprevalence of both viruses in *Rousettus aegyptiacus*. *BMC Infect Dis.* 2009;9:159. doi: 10.1186/1471-2334-9-159. PubMed PMID: 19785757; PubMed Central PMCID: PMC2761397.
256. Hayman D. T., Yu M., Cramer G., Wang L. F., Suu-Ire R., Wood J. L., et al. Ebola virus antibodies in fruit bats, Ghana, West Africa. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(7):1207-9. doi: 10.3201/eid1807.111654. PubMed PMID: 22710257; PubMed Central PMCID: PMC3376795.
257. Hayman D. T., Emmerich P., Yu M., Wang L. F., Suu-Ire R., Fooks A. R., et al. Long-term survival of an urban fruit bat seropositive for Ebola and Lagos bat viruses. *PLoS One.* 2010;5(8):e11978. doi: 10.1371/journal.pone.0011978. PubMed PMID: 20694141; PubMed Central PMCID: PMC2915915.
258. Ogawa H., Miyamoto H., Nakayama E., Yoshida R., Nakamura I., Sawa H., et al. Seroepidemiological Prevalence of Multiple Species of Filoviruses in Fruit Bats (*Eidolon helvum*) Migrating in Africa. *J Infect Dis.* 2015. doi: 10.1093/infdis/jiv063. PubMed PMID: 25786916.
259. Yuan J., Zhang Y., Li J., Zhang Y., Wang L. F., Shi Z. Serological evidence of ebolavirus infection in bats, China. *Virol J.* 2012;9:236. doi: 10.1186/1743-422X-9-236. PubMed PMID: 23062147; PubMed Central PMCID: PMC3492202.

260. Jayme S. I., Field H. E., de Jong C., Olival K. J., Marsh G., Tagtag A. M., et al. Molecular evidence of Ebola Reston virus infection in Philippine bats. *Viol J.* 2015;12:107. doi: 10.1186/s12985-015-0331-3. PubMed PMID: 26184657; PubMed Central PMCID: PMC4504098.
261. Olival K. J., Islam A., Yu M., Anthony S. J., Epstein J. H., Khan S. A., et al. Ebola virus antibodies in fruit bats, bangladesh. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(2):270-3. doi: 10.3201/eid1902.120524. PubMed PMID: 23343532; PubMed Central PMCID: PMC3559038.
262. Leendertz S. A., Gogarten J. F., Dux A., Calvignac-Spencer S., Leendertz F. H. Assessing the Evidence Supporting Fruit Bats as the Primary Reservoirs for Ebola Viruses. *EcoHealth.* 2015. doi: 10.1007/s10393-015-1053-0. PubMed PMID: 26268210.
263. Forbes K. M., Webala P. W., Jaaskelainen A. J., Abdurahman S., Ogola J., Masika M. M., et al. Bombali Virus in Mops condylurus Bat, Kenya. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(5). Epub 2019/04/20. doi: 10.3201/eid2505.181666. PubMed PMID: 31002301; PubMed Central PMCID: PMCPMC6478230.
264. Karan L. S., Makenov M. T., Korneev M. G., Sacko N., Boumbaly S., Yakovlev S. A., et al. Bombali Virus in Mops condylurus Bats, Guinea. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(9). Epub 2019/07/17. doi: 10.3201/eid2509.190581. PubMed PMID: 31310231; PubMed Central PMCID: PMCPMC6711222.
265. NanoEnTek. EVE™ Automatic Cell Counter User Manual 2013. Available from: www.nanoentek.com.
266. Eckerle I., Lenk M., Ulrich R. G. More novel hantaviruses and diversifying reservoir hosts--time for development of reservoir-derived cell culture models? *Viruses.* 2014;6(3):951-67. Epub 2014/03/01. doi: 10.3390/v6030951. PubMed PMID: 24576845; PubMed Central PMCID: PMCPMC3970132.
267. Bokelmann M., Edenborough K., Hetzelt N., Kreher P., Lander A., Nitsche A., et al. Utility of primary cells to examine NPC1 receptor expression in Mops condylurus, a potential Ebola virus reservoir. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020;14(1):e0007952. Epub 2020/01/22. doi: 10.1371/journal.pntd.0007952. PubMed PMID: 31961874.
268. ABM. Cell Immortalization Handbook V8. Available from: <https://www.abmgood.com/>.
269. Wilhelm S. , Gröbler B. , Gluch M. , Heinz H. Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie Jena2001. Available from: www.zeiss.de/lsm.
270. Kärber G. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol.* 1931;162(4):480-3. doi: 10.1007/BF01863914.
271. Spearman C. The Method of 'Right and Wrong Cases' ('Constant Stimuli') without Gauss's Formulae. *Br J Psychol.* 1908;2(3):227-42.

272. Muhldorfer K., Speck S., Kurth A., Lesnik R., Freuling C., Muller T., et al. Diseases and causes of death in European bats: dynamics in disease susceptibility and infection rates. *PLoS One*. 2011;6(12):e29773. doi: 10.1371/journal.pone.0029773. PubMed PMID: 22216354; PubMed Central PMCID: PMC3247292.
273. PEQLAB. *peqGOLD Viral DNA/RNA Kit Manual* 2015. Available from: <https://de.vwr.com/store/product/16808637/viral-dna-rna-kit-peqgold>.
274. Roche. *High Pure PCR Product Purification Kit* 2017. Available from: <https://lifescience.roche.com/>.
275. Thermo Fisher Scientific. *Qubit® dsDNA HS Assay Kit Manual* 2015. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q32851#/Q32851>.
276. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(12):5463-7. Epub 1977/12/01. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463. PubMed PMID: 271968; PubMed Central PMCID: PMC431765.
277. Applied Biosystems™. *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit User Guide* 2018. Available from: <https://www.thermofisher.com/>.
278. Qiagen. *QIAamp Viral RNA Mini Handbook* 2020. Available from: <https://www.qiagen.com/gb/resources/resourcedetail?id=c80685c0-4103-49ea-aa72-8989420e3018&lang=en>.
279. Conceicao-Neto N., Zeller M., Lefrere H., De Bruyn P., Beller L., Deboutte W., et al. Modular approach to customise sample preparation procedures for viral metagenomics: a reproducible protocol for virome analysis. *Sci Rep*. 2015;5:16532. Epub 2015/11/13. doi: 10.1038/srep16532. PubMed PMID: 26559140; PubMed Central PMCID: PMC4642273.
280. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162(1):156-9. Epub 1987/04/01. doi: 10.1006/abio.1987.9999. PubMed PMID: 2440339.
281. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*. 1993;15(3):532-4, 6-7. Epub 1993/09/01. PubMed PMID: 7692896.
282. Invitrogen. *TRIzol™ LS Reagent User Guide* 2016. Available from: <https://thermofisher.com/>.
283. Victoria J. G., Kapoor A., Dupuis K., Schnurr D. P., Delwart E. L. Rapid identification of known and new RNA viruses from animal tissues. *PLoS Pathog*. 2008;4(9):e1000163-e. doi: 10.1371/journal.ppat.1000163. PubMed PMID: 18818738.
284. Stang A., Korn K., Wildner O., Uberla K. Characterization of virus isolates by particle-associated nucleic acid PCR. *J Clin Microbiol*. 2005;43(2):716-20. Epub 2005/02/08. doi: 10.1128/jcm.43.2.716-720.2005. PubMed PMID: 15695669; PubMed Central PMCID: PMC4548055.

285. Qiagen. MinElute® Handbook 2020. Available from: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=8f6b09b2-6dcd-4b55-bb4a-255ede40ca3b&lang=en>.
286. Macherey-Nagel. NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-Up - User manual 2017. Available from: <https://www.mn-net.com/de>.
287. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A. A., Dvorkin M., Kulikov A. S., et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology*. 2012;19(5):455-77. Epub 2012/04/16. doi: 10.1089/cmb.2012.0021. PubMed PMID: 22506599.
288. Li H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. ArXiv ID:: 13033997v2. 2013.
289. Piro V. C., Dadi T. H., Seiler E., Reinert K., Renard B. Y. ganon: precise metagenomics classification against large and up-to-date sets of reference sequences. *bioRxiv*. 2019:406017. doi: 10.1101/406017.
290. Brister J. R., Ako-Adjei D., Bao Y., Blinkova O. NCBI viral genomes resource. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(Database issue):D571-7. Epub 2014/11/28. doi: 10.1093/nar/gku1207. PubMed PMID: 25428358; PubMed Central PMCID: PMC4383986.
291. Barnard S. M. *Bats In Captivity - Volume 3: Diet and Feeding - Environment and Housing*. 1. ed. USA, Washington, DC: Logos Press 2011.
292. Li L., Victoria J. G., Wang C., Jones M., Fellers G. M., Kunz T. H., et al. Bat guano virome: predominance of dietary viruses from insects and plants plus novel mammalian viruses. *J Virol*. 2010;84(14):6955-65. doi: 10.1128/JVI.00501-10. PubMed PMID: 20463061; PubMed Central PMCID: PMC2898246.
293. Ge X., Li Y., Yang X., Zhang H., Zhou P., Zhang Y., et al. Metagenomic analysis of viruses from bat fecal samples reveals many novel viruses in insectivorous bats in China. *J Virol*. 2012;86(8):4620-30. doi: 10.1128/JVI.06671-11. PubMed PMID: 22345464; PubMed Central PMCID: PMC3318625.
294. Donaldson E. F., Haskew A. N., Gates J. E., Huynh J., Moore C. J., Frieman M. B. Metagenomic analysis of the viromes of three North American bat species: viral diversity among different bat species that share a common habitat. *J Virol*. 2010;84(24):13004-18. doi: 10.1128/JVI.01255-10. PubMed PMID: 20926577; PubMed Central PMCID: PMC3004358.
295. Wu Z., Yang L., Ren X., He G., Zhang J., Yang J., et al. Deciphering the bat virome catalog to better understand the ecological diversity of bat viruses and the bat origin of emerging infectious diseases. *The ISME journal*. 2016;10(3):609-20. Epub 2015/08/11. doi: 10.1038/ismej.2015.138. PubMed PMID: 26262818.

296. Geldenhuys M., Mortlock M., Weyer J., Bezuidt O., Seamark E. C. J., Kearney T., et al. A metagenomic viral discovery approach identifies potential zoonotic and novel mammalian viruses in *Neoromicia* bats within South Africa. *PLoS One*. 2018;13(3):e0194527. Epub 2018/03/27. doi: 10.1371/journal.pone.0194527. PubMed PMID: 29579103; PubMed Central PMCID: PMC5868816.
297. Jansen van Vuren P., Allam M., Wiley M. R., Ismail A., Storm N., Birkhead M., et al. A novel adenovirus isolated from the Egyptian fruit bat in South Africa is closely related to recent isolates from China. *Sci Rep*. 2018;8(1):9584. doi: 10.1038/s41598-018-27836-w.
298. Kobayashi T., Matsugo H., Maruyama J., Kamiki H., Takada A., Maeda K., et al. Characterization of a novel species of adenovirus from Japanese microbat and role of CXADR as its entry factor. *Sci Rep*. 2019;9(1):573. doi: 10.1038/s41598-018-37224-z.
299. Baker K. S., Leggett R. M., Bexfield N. H., Alston M., Daly G., Todd S., et al. Metagenomic study of the viruses of African straw-coloured fruit bats: detection of a chiropteran poxvirus and isolation of a novel adenovirus. *Virology*. 2013;441(2):95-106. doi: 10.1016/j.virol.2013.03.014. PubMed PMID: 23562481; PubMed Central PMCID: PMC3667569.
300. Zhang H., Todd S., Tachedjian M., Barr J. A., Luo M., Yu M., et al. A novel bat herpesvirus encodes homologues of major histocompatibility complex classes I and II, C-type lectin, and a unique family of immune-related genes. *J Virol*. 2012;86(15):8014-30. Epub 2012/05/23. doi: 10.1128/JVI.00723-12. PubMed PMID: 22623774.
301. Jánoska M., Vidovszky M., Molnár V., Liptovszky M., Harrach B., Benko M. Novel adenoviruses and herpesviruses detected in bats. *Vet J*. 2011;189(1):118-21. Epub 2010/09/04. doi: 10.1016/j.tvjl.2010.06.020. PubMed PMID: 20813566.
302. Dacheux L., Cervantes-Gonzalez M., Guigon G., Thiberge J.-M., Vandenbergert M., Maufrais C., et al. A Preliminary Study of Viral Metagenomics of French Bat Species in Contact with Humans: Identification of New Mammalian Viruses. *PLoS One*. 2014;9(1):e87194. doi: 10.1371/journal.pone.0087194.
303. Waruhiu C., Ommeh S., Obanda V., Agwanda B., Gakuya F., Ge X.-Y., et al. Molecular detection of viruses in Kenyan bats and discovery of novel astroviruses, caliciviruses and rotaviruses. *Virol Sin*. 2017;32(2):101-14. Epub 2017/04/06. doi: 10.1007/s12250-016-3930-2. PubMed PMID: 28393313.
304. Krupovic M., Ghabrial S., Jiang D., Varsani A. Genomoviridae: a new family of widespread single-stranded DNA viruses. *Arch Virol*. 2016;161:2633-43. doi: 10.1007/s00705-016-2943-3.
305. Male M. F., Kraberger S., Stainton D., Kami V., Varsani A. Cycloviruses, gemycircularviruses and other novel replication-associated protein encoding circular viruses in Pacific flying fox (*Pteropus tonganus*) faeces. *Infect Genet Evol*. 2016;39:279-92. Epub 2016/02/14. doi: 10.1016/j.meegid.2016.02.009. PubMed PMID: 26873064.
306. Kielian M., Mettenleiter T.C., Roossinck M.J. *Advances in Virus Research*. 1st ed. Cambridge, USA: Academic Press; 2019. 210 p.

307. Salmier A., Tirera S., de Thoisy B., Franc A., Darcissac E., Donato D., et al. Virome analysis of two sympatric bat species (*Desmodus rotundus* and *Molossus molossus*) in French Guiana. *PLoS One*. 2017;12(11):e0186943-e. doi: 10.1371/journal.pone.0186943. PubMed PMID: 29117243.
308. Wu Z., Ren X., Yang L., Hu Y., Yang J., He G., et al. Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bat species from Chinese provinces. *J Virol*. 2012;86(20):10999-1012. Epub 2012/08/01. doi: 10.1128/JVI.01394-12. PubMed PMID: 22855479.
309. Muhldorfer K. Bats and bacterial pathogens: a review. *Zoonoses Public Health*. 2013;60(1):93-103. doi: 10.1111/j.1863-2378.2012.01536.x. PubMed PMID: 22862791.
310. Mühldorfer K., Speck S., Wibbelt G. Diseases in free-ranging bats from Germany. *BMC Vet Res*. 2011;7:61-. doi: 10.1186/1746-6148-7-61. PubMed PMID: 22008235.
311. Mahy B. W. J., van Regenmortel M. H. V. *Encyclopedia of Virology*. Third ed. Miller BR, editor: Academic Press; 2008. 3234 p.
312. Edenborough K. M., Mu A., Muhldorfer K., Lechner J., Lander A., Bokelmann M., et al. Microbiomes in the insectivorous bat species *Mops condylurus* rapidly converge in captivity. *PLoS One*. 2020;15(3):e0223629. Epub 2020/03/21. doi: 10.1371/journal.pone.0223629. PubMed PMID: 32196505; PubMed Central PMCID: PMC7083271.
313. Cadwell K. The virome in host health and disease. *Immunity*. 2015;42(5):805-13. doi: 10.1016/j.immuni.2015.05.003. PubMed PMID: 25992857.
314. Mukhopadhyaya I., Segal J. P., Carding S. R., Hart A. L., Hold G. L. The gut virome: the 'missing link' between gut bacteria and host immunity? *Therap Adv Gastroenterol*. 2019;12:1756284819836620-. doi: 10.1177/1756284819836620. PubMed PMID: 30936943.
315. Wahl-Jensen V. M., Afanasieva T. A., Seebach J., Ströher U., Feldmann H., Schnittler H.-J. Effects of Ebola Virus Glycoproteins on Endothelial Cell Activation and Barrier Function. *J Virol*. 2005;79(16):10442-50. doi: 10.1128/jvi.79.16.10442-10450.2005.
316. Bart S. M., Cohen C., Dye J. M., Shorter J., Bates P. Enhancement of Ebola virus infection by seminal amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(28):7410-5. Epub 2018/06/25. doi: 10.1073/pnas.1721646115. PubMed PMID: 29941593.
317. Kuroda M., Halfmann P. J., Hill-Batorski L., Ozawa M., Lopes T. J. S., Neumann G., et al. Identification of interferon-stimulated genes that attenuate Ebola virus infection. *Nature Communications*. 2020;11(1):2953. doi: 10.1038/s41467-020-16768-7.
318. Nelson E. A., Dyal J., Hoenen T., Barnes A. B., Zhou H., Liang J. Y., et al. The phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase inhibitor apilimod blocks filoviral entry and infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(4):e0005540-e. doi: 10.1371/journal.pntd.0005540. PubMed PMID: 28403145.

319. Iampietro M., Younan P., Nishida A., Dutta M., Lubaki N. M., Santos R. I., et al. Ebola virus glycoprotein directly triggers T lymphocyte death despite of the lack of infection. *PLoS Pathog.* 2017;13(5):e1006397. Epub 2017/05/26. doi: 10.1371/journal.ppat.1006397. PubMed PMID: 28542576; PubMed Central PMCID: PMC5456411.
320. Geisbert T. W., Young H. A., Jahrling P. B., Davis K. J., Larsen T., Kagan E., et al. Pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever in primate models: evidence that hemorrhage is not a direct effect of virus-induced cytolysis of endothelial cells. *The American journal of pathology.* 2003;163(6):2371-82. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63592-4. PubMed PMID: 14633609.
321. Drelich A., Judy B., He X., Chang Q., Yu S., Li X., et al. Exchange Protein Directly Activated by cAMP Modulates Ebola Virus Uptake into Vascular Endothelial Cells. *Viruses.* 2018;10(10):563. doi: 10.3390/v10100563. PubMed PMID: 30332733.
322. Zhang X., Ao Z., Bello A., Ran X., Liu S., Wigle J., et al. Characterization of the inhibitory effect of an extract of *Prunella vulgaris* on Ebola virus glycoprotein (GP)-mediated virus entry and infection. *Antiviral Res.* 2016;127:20-31. Epub 2016/01/09. doi: 10.1016/j.antiviral.2016.01.001. PubMed PMID: 26778707.
323. Miller M. R., McMinn R. J., Misra V., Schountz T., Muller M. A., Kurth A., et al. Broad and Temperature Independent Replication Potential of Filoviruses on Cells Derived From Old and New World Bat Species. *J Infect Dis.* 2016. doi: 10.1093/infdis/jiw199. PubMed PMID: 27354372.
324. Wool-Lewis R. J., Bates P. Characterization of Ebola virus entry by using pseudotyped viruses: identification of receptor-deficient cell lines. *J Virol.* 1998;72(4):3155-60. Epub 1998/04/03. PubMed PMID: 9525641; PubMed Central PMCID: PMC109772.
325. He X., Korytář T., Zhu Y., Pikula J., Bandouchova H., Zukal J., et al. Establishment of Myotis myotis Cell Lines - Model for Investigation of Host-Pathogen Interaction in a Natural Host for Emerging Viruses. *PLoS One.* 2014;9(10):e109795. doi: 10.1371/journal.pone.0109795. PubMed PMID: PMC4190323.
326. Takada A., Robison C., Goto H., Sanchez A., Murti K. G., Whitt M. A., et al. A system for functional analysis of Ebola virus glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(26):14764-9. Epub 1998/02/07. PubMed PMID: 9405687; PubMed Central PMCID: PMC109772.
327. Kuhl A., Hoffmann M., Muller M. A., Munster V. J., Gnirss K., Kiene M., et al. Comparative analysis of Ebola virus glycoprotein interactions with human and bat cells. *J Infect Dis.* 2011;204 Suppl 3:S840-9. doi: 10.1093/infdis/jir306. PubMed PMID: 21987760; PubMed Central PMCID: PMC3189982.
328. Krahling V., Dolnik O., Kolesnikova L., Schmidt-Chanasit J., Jordan I., Sandig V., et al. Establishment of fruit bat cells (*Rousettus aegyptiacus*) as a model system for the investigation of filoviral infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(8):e802. doi: 10.1371/journal.pntd.0000802. PubMed PMID: 20808767; PubMed Central PMCID: PMC2927428.

329. Kuzmin I. V., Schwarz T. M., Ilinykh P. A., Jordan I., Ksiazek T. G., Sachidanandam R., et al. Innate Immune Response of Bat and Human Cells to Filoviruses: Commonalities and Distinctions. *J Virol.* 2017. Epub 2017/01/27. doi: 10.1128/jvi.02471-16. PubMed PMID: 28122983.
330. Hoffmann M., Gonzalez Hernandez M., Berger E., Marzi A., Pohlmann S. The Glycoproteins of All Filovirus Species Use the Same Host Factors for Entry into Bat and Human Cells but Entry Efficiency Is Species Dependent. *PLoS One.* 2016;11(2):e0149651. doi: 10.1371/journal.pone.0149651. PubMed PMID: 26901159.
331. Wynne J. W., Todd S., Boyd V., Tachedjian M., Klein R., Shiell B., et al. Comparative Transcriptomics Highlights the Role of the Activator Protein 1 Transcription Factor in the Host Response to Ebolavirus. *J Virol.* 2017;91(23). Epub 2017/09/22. doi: 10.1128/jvi.01174-17. PubMed PMID: 28931675; PubMed Central PMCID: PMC5686711.
332. Welser-Alves J. The Advantages and Difficulties of Working with Primary Cells ScienCell Research Laboratories 2016 [05/2020]. Available from: <https://scienCellonline.com/blog/the-advantages-and-difficulties-of-working-with-primary-cells/>.
333. Pan C., Kumar C., Bohl S., Klingmueller U., Mann M. Comparative proteomic phenotyping of cell lines and primary cells to assess preservation of cell type-specific functions. *Mol Cell Proteomics.* 2009;8(3):443-50. Epub 2008/10/28. doi: 10.1074/mcp.M800258-MCP200. PubMed PMID: 18952599; PubMed Central PMCID: PMC2649808.
334. ATCC. Passage Number Effects in Cell Lines 2016 [07/2020]. Available from: [https://www.lgcstandards-atcc.org/Services/Testing_Services/Cell_Authentication_Testing_Service/Passage Number Effects in Cell Lines.aspx?geo_country=de](https://www.lgcstandards-atcc.org/Services/Testing_Services/Cell_Authentication_Testing_Service/Passage_Number_Effects_in_Cell_Lines.aspx?geo_country=de).
335. Hughes P., Marshall D., Reid Y., Parkes H., Gelber C. The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need? *Biotechniques.* 2007;43(5):575, 7-8, 81-2 passim. Epub 2007/12/13. doi: 10.2144/000112598. PubMed PMID: 18072586.
336. Sambuy Y., De Angelis I., Ranaldi G., Scarino M. L., Stamatii A., Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol.* 2005;21(1):1-26. Epub 2005/05/04. doi: 10.1007/s10565-005-0085-6. PubMed PMID: 15868485.
337. Briske-Anderson M. J., Finley J. W., Newman S. M. The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1997;214(3):248-57. Epub 1997/03/01. doi: 10.3181/00379727-214-44093. PubMed PMID: 9083258.
338. Chang-Liu C. M., Woloschak G. E. Effect of passage number on cellular response to DNA-damaging agents: cell survival and gene expression. *Cancer Lett.* 1997;113(1-2):77-86. Epub 1997/02/26. doi: 10.1016/s0304-3835(97)04599-0. PubMed PMID: 9065805.

339. Yu H., Cook T. J., Sinko P. J. Evidence for diminished functional expression of intestinal transporters in Caco-2 cell monolayers at high passages. *Pharm Res.* 1997;14(6):757-62. Epub 1997/06/01. doi: 10.1023/a:1012150405949. PubMed PMID: 9210193.
340. Langeler E. G., van Uffelen C. J., Blankenstein M. A., van Steenbrugge G. J., Mulder E. Effect of culture conditions on androgen sensitivity of the human prostatic cancer cell line LNCaP. *Prostate.* 1993;23(3):213-23. Epub 1993/01/01. doi: 10.1002/pros.2990230304. PubMed PMID: 7694266.
341. Esquenet M., Swinnen J. V., Heyns W., Verhoeven G. LNCaP prostatic adenocarcinoma cells derived from low and high passage numbers display divergent responses not only to androgens but also to retinoids. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1997;62(5-6):391-9. Epub 1997/08/01. doi: 10.1016/s0960-0760(97)00054-x. PubMed PMID: 9449242.
342. Kwist K., Bridges W. C., Burg K. J. L. The effect of cell passage number on osteogenic and adipogenic characteristics of D1 cells. *Cytotechnology.* 2016;68(4):1661-7. Epub 2015/07/25. doi: 10.1007/s10616-015-9883-8. PubMed PMID: 26208915.
343. Hölzer M., Krähling V., Amman F., Barth E., Bernhart S. H., Carmelo V. A. O., et al. Differential transcriptional responses to Ebola and Marburg virus infection in bat and human cells. *Sci Rep.* 2016;6:34589. doi: 10.1038/srep34589. PubMed PMID: PMC5054393.
344. Zhao X., Zhao Q., Luo Z., Yu Y., Xiao N., Sun X., et al. Spontaneous immortalization of mouse liver sinusoidal endothelial cells. *Int J Mol Med.* 2015;35(3):617-24. doi: 10.3892/ijmm.2015.2067. PubMed PMID: 25585915; PubMed Central PMCID: PMC4314414.
345. Christman S. A., Kong B. W., Landry M. M., Kim H., Foster D. N. Contributions of differential p53 expression in the spontaneous immortalization of a chicken embryo fibroblast cell line. *BMC Cell Biol.* 2006;7:27. Epub 2006/07/04. doi: 10.1186/1471-2121-7-27. PubMed PMID: 16813656; PubMed Central PMCID: PMC1533818.
346. Rhim J. S. Development of human cell lines from multiple organs. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;919:16-25. Epub 2000/11/18. PubMed PMID: 11083093.
347. Bols N. C., Pham P. H., Dayeh V. R., Lee L. E. J. Invitromatics, invitrome, and invitroomics: introduction of three new terms for in vitro biology and illustration of their use with the cell lines from rainbow trout. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2017;53(5):383-405. doi: 10.1007/s11626-017-0142-5. PubMed PMID: 28374170.
348. Macieira-Coelho A., Azzarone B. The transition from primary culture to spontaneous immortalization in mouse fibroblast populations. *Anticancer Res.* 1988;8(4):669-76. Epub 1988/07/01. PubMed PMID: 3178157.
349. Hoffmann M., Muller M. A., Drexler J. F., Glende J., Erdt M., Gutzkow T., et al. Differential sensitivity of bat cells to infection by enveloped RNA viruses: coronaviruses, paramyxoviruses, filoviruses, and influenza viruses. *PLoS One.* 2013;8(8):e72942. doi: 10.1371/journal.pone.0072942. PubMed PMID: 24023659; PubMed Central PMCID: PMC3758312.

350. Cramer G., Todd S., Grimley S., McEachern J. A., Marsh G. A., Smith C., et al. Establishment, immortalisation and characterisation of Pteropid Bat Cell Lines. *PLoS One*. 2009;4(12):e8266. doi: 10.1371/journal.pone.0008266. PubMed PMID: PMC2788226.
351. Chandel N. S., Jasper H., Ho T. T., Passegue E. Metabolic regulation of stem cell function in tissue homeostasis and organismal ageing. *Nat Cell Biol*. 2016;18(8):823-32. Epub 2016/07/19. doi: 10.1038/ncb3385. PubMed PMID: 27428307.
352. Maxfield F. R., Wustner D. Intracellular cholesterol transport. *J Clin Invest*. 2002;110(7):891-8. Epub 2002/10/09. doi: 10.1172/jci16500. PubMed PMID: 12370264; PubMed Central PMCID: PMCPMC151159.
353. Iaea D. B., Maxfield F. R. Cholesterol trafficking and distribution. *Essays Biochem*. 2015;57:43-55. Epub 2015/02/07. doi: 10.1042/bse0570043. PubMed PMID: 25658343.
354. Adebali O., Reznik A. O., Ory D. S., Zhulin I. B. Establishing the precise evolutionary history of a gene improves prediction of disease-causing missense mutations. *Genet Med*. 2016;18:1029. doi: 10.1038/gim.2015.208
<https://www.nature.com/articles/gim2015208#supplementary-information>.
355. Zheng J.-C., Sun S.-L., Yue X.-R., Liu T.-X., Jing X. Phylogeny and evolution of the cholesterol transporter NPC1 in insects. *J Insect Physiol*. 2018;107:157-66. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2018.04.007>.
356. Feldmann H., Geisbert T. W. Ebola haemorrhagic fever. *Lancet*. 2011;377(9768):849-62. Epub 2010/11/19. doi: 10.1016/s0140-6736(10)60667-8. PubMed PMID: 21084112; PubMed Central PMCID: PMCPMC3406178.
357. Cifuentes-Muñoz N., Dutch R. E., Cattaneo R. Direct cell-to-cell transmission of respiratory viruses: The fast lanes. *PLoS Pathog*. 2018;14(6):e1007015-e. doi: 10.1371/journal.ppat.1007015. PubMed PMID: 29953542.
358. Chu J. J. H., Ng M. The mechanism of cell death during West Nile virus infection is dependent on initial infectious dose. *The Journal of general virology*. 2003;84:3305-14. doi: 10.1099/vir.0.19447-0.
359. Misasi J., Sullivan N. J. Camouflage and misdirection: the full-on assault of ebola virus disease. *Cell*. 2014;159(3):477-86. doi: 10.1016/j.cell.2014.10.006. PubMed PMID: 25417101; PubMed Central PMCID: PMC4243531.
360. He B., Feng Y., Zhang H., Xu L., Yang W., Zhang Y., et al. Filovirus RNA in Fruit Bats, China. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(9):1675-7. doi: 10.3201/eid2109.150260. PubMed PMID: 26291173.
361. Yang X.-L., Zhang Y.-Z., Jiang R.-D., Guo H., Zhang W., Li B., et al. Genetically Diverse Filoviruses in Rousettus and Eonycteris spp. Bats, China, 2009 and 2015. *Emerg Infect Dis*. 2017;23(3):482-6. doi: 10.3201/eid2303.161119. PubMed PMID: 28221123.

362. Prescott J., de Wit E., Feldmann H., Munster V. J. The immune response to Nipah virus infection. *Arch Virol.* 2012;157(9):1635-41. doi: 10.1007/s00705-012-1352-5. PubMed PMID: 22669317; PubMed Central PMCID: PMC3432143.
363. Frahm S. Systematische Untersuchung der Inkulturnahme adhärent wachsender Zellen Lübeck: Universität zu Lübeck; 2014. Available from: <http://publica.fraunhofer.de/dokumente/N-439347.html>.
364. Frisch S. M., Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *The Journal of cell biology.* 1994;124(4):619-26. doi: 10.1083/jcb.124.4.619. PubMed PMID: 8106557.
365. Bretland A. J., Lawry J., Sharrard R. M. A study of death by anoikis in cultured epithelial cells. *Cell Prolif.* 2001;34(4):199-210. doi: 10.1046/j.1365-2184.2001.00198.x. PubMed PMID: 11529878.
366. Ma X.-K., Wang L., Li Y., Yang X.-M., Zhao P., Hao T., et al. HAb18G/CD147 cell-cell contacts confer resistance of a HEK293 subpopulation to anoikis in an E-cadherin-dependent manner. *BMC Cell Biol.* 2010;11:27-. doi: 10.1186/1471-2121-11-27. PubMed PMID: 20398401.
367. Hassett R. P., Crockett E. L. Habitat temperature is an important determinant of cholesterol contents in copepods. *J Exp Biol.* 2009;212(Pt 1):71-7. doi: 10.1242/jeb.020552. PubMed PMID: 19088212; PubMed Central PMCID: PMC2749703.
368. Crockett E. L. Cholesterol function in plasma membranes from ectotherms: Membrane-specific roles in adaptation to temperature. *Am Zool.* 1998;38:291-304.
369. Cooper G. M. *The Cell: A Molecular Approach - Structure of the Plasma Membrane.* 2nd edition ed. Sunderland, USA: Sinauer Associates Inc.; 2000. 689 p.
370. Simons K., Ikonen E. How cells handle cholesterol. *Science.* 2000;290(5497):1721-6. Epub 2000/12/02. PubMed PMID: 11099405.
371. Thorne S. H., Brooks G., Lee Y.-L., Au T., Eng L. F., Reid T. Effects of Febrile Temperature on Adenoviral Infection and Replication: Implications for Viral Therapy of Cancer. *J Virol.* 2005;79(1):581. doi: 10.1128/JVI.79.1.581-591.2005.
372. Scholtissek C., Rott R. Effect of temperature on the multiplication of an Influenza virus. *J Gen Virol.* 1969;5(2):283-90. Epub 1969/09/01. doi: 10.1099/0022-1317-5-2-283. PubMed PMID: 5347407.
373. Hayman D. T. S., Bowen R. A., Cryan P. M., McCracken G. F., O'Shea T. J., Peel A. J., et al. Ecology of zoonotic infectious diseases in bats: current knowledge and future directions. *Zoonoses and public health.* 2013;60(1):2-21. Epub 2012/09/07. doi: 10.1111/zph.12000. PubMed PMID: 22958281.
374. La Motte L. C. Jr. JAPANESE B ENCEPHALITIS IN BATS DURING SIMULATED HIBERNATION1. *Am J Epidemiol.* 1958;67(1):101-8. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a119912.

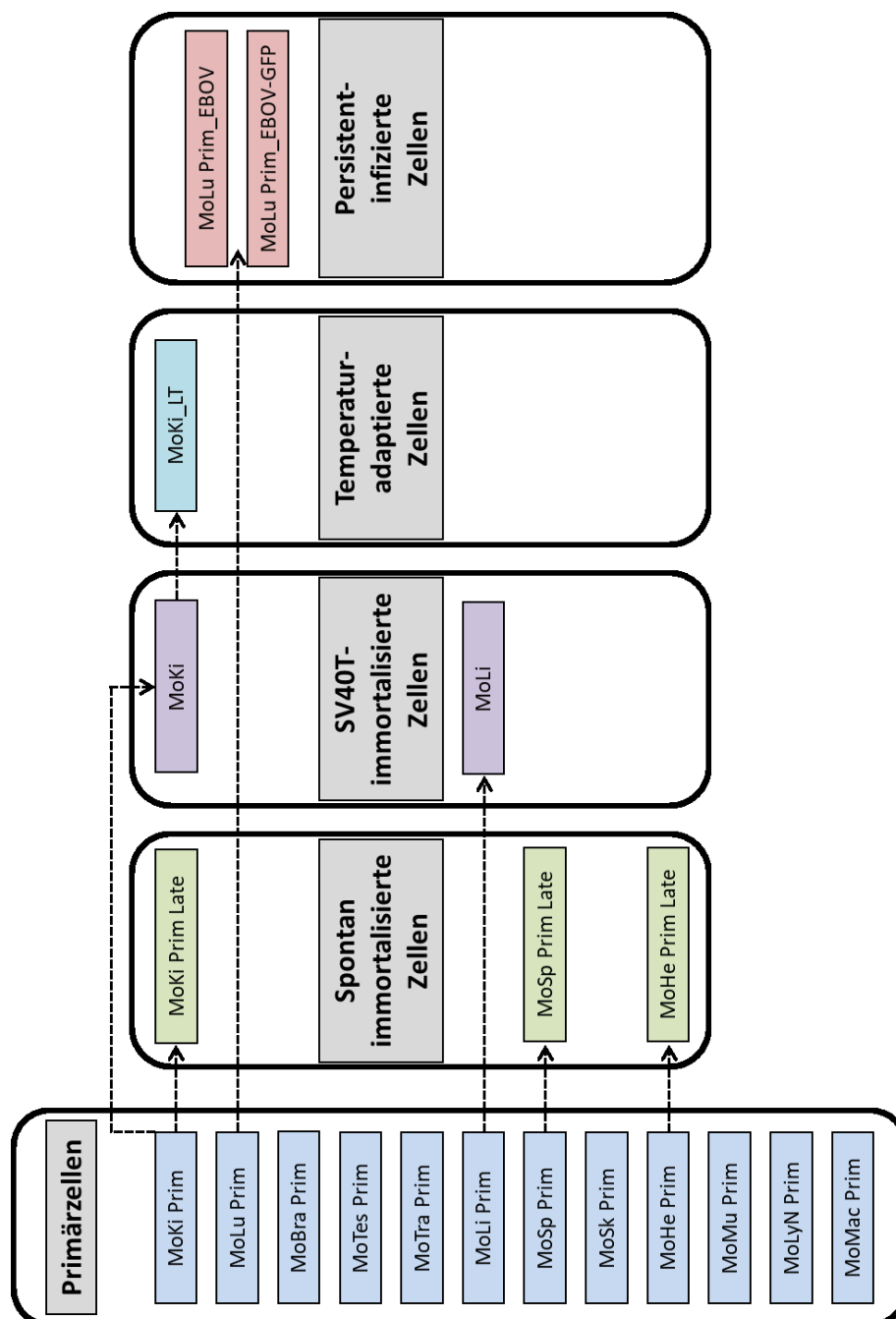
375. Sulkin S. E., Allen R., Sims R., Kruttsch P. H., Kim C. STUDIES ON THE PATHOGENESIS OF RABIES IN INSECTIVOROUS BATS : II. INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL TEMPERATURE. *The Journal of experimental medicine*. 1960;112(4):595-617. doi: 10.1084/jem.112.4.595. PubMed PMID: 19867178.
376. Eckert R. *Tierphysiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2002.
377. Stockmaier S., Dechmann D. K., Page R. A., O'Mara M. T. No fever and leucocytosis in response to a lipopolysaccharide challenge in an insectivorous bat. *Biol Lett*. 2015;11(9). doi: 10.1098/rsbl.2015.0576. PubMed PMID: 26333664.
378. Van Cakenberghe V., Gembu Tungaluna G.-C., Musaba Akawa P., Seamark E., Verheyen E. The bats of the Congo and of Rwanda and Burundi revisited (Mammalia: Chiroptera). 2017. 2017;(382). Epub 2017-12-18. doi: 10.5852/ejt.2017.382.
379. Peterson A. T., Carroll D. S., Mills J. N., Johnson K. M. Potential mammalian filovirus reservoirs. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(12):2073-81. doi: 10.3201/eid1012.040346. PubMed PMID: 15663841; PubMed Central PMCID: PMC3323391.
380. Amman B. R., Schuh A. J., Sealy T. K., Spengler J. R., Welch S. R., Kirejczyk S. G. M., et al. Experimental infection of Egyptian rousette bats (*Rousettus aegyptiacus*) with *Sosuga* virus demonstrates potential transmission routes for a bat-borne human pathogenic paramyxovirus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14(3):e0008092-e. doi: 10.1371/journal.pntd.0008092. PubMed PMID: 32119657.
381. Amman B. R., Albariño C. G., Bird B. H., Nyakarahuka L., Sealy T. K., Balinandi S., et al. A Recently Discovered Pathogenic Paramyxovirus, *Sosuga* Virus, is Present in *Rousettus aegyptiacus* Fruit Bats at Multiple Locations in Uganda. *J Wildl Dis*. 2015;51(3):774-9. Epub 2015/04/28. doi: 10.7589/2015-02-044. PubMed PMID: 25919464.
382. Kalunda M., Mukwaya L. G., Mukuye A., Lule M., Sekyalo E., Wright J., et al. Kasokero virus: a new human pathogen from bats (*Rousettus aegyptiacus*) in Uganda. *Am J Trop Med Hyg*. 1986;35(2):387-92. Epub 1986/03/01. doi: 10.4269/ajtmh.1986.35.387. PubMed PMID: 3082234.
383. Shehata M., Chu D. K. W., Gomaa M., AbiSaid M., El Shesheny R., Kandeil A., et al. Surveillance for Coronaviruses in Bats, Lebanon and Egypt, 2013–2015. *Emerging Infectious Disease journal*. 2016;22(1):148. doi: 10.3201/eid2201.151397.
384. Strong J. E., Wong G., Jones S. E., Grolla A., Theriault S., Kobinger G. P., et al. Stimulation of Ebola virus production from persistent infection through activation of the Ras/MAPK pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(46):17982-7. doi: 10.1073/pnas.0809698105. PubMed PMID: 18981410; PubMed Central PMCID: PMC2577702.

7 Anhang

7.1 Abbildungen

Anhang, Abbildung 0: Übersicht über unterschiedliche Typen von Zellkulturen aus *M. condylurus*

Verwendete primäre, spontan immortalisierte, SV40T-immortalisierte, temperatur-adaptierte und persistent-infizierte Zellen. Die Pfeile indizieren die Ursprungszellkultur, aus welcher die Entwicklung erfolgte.



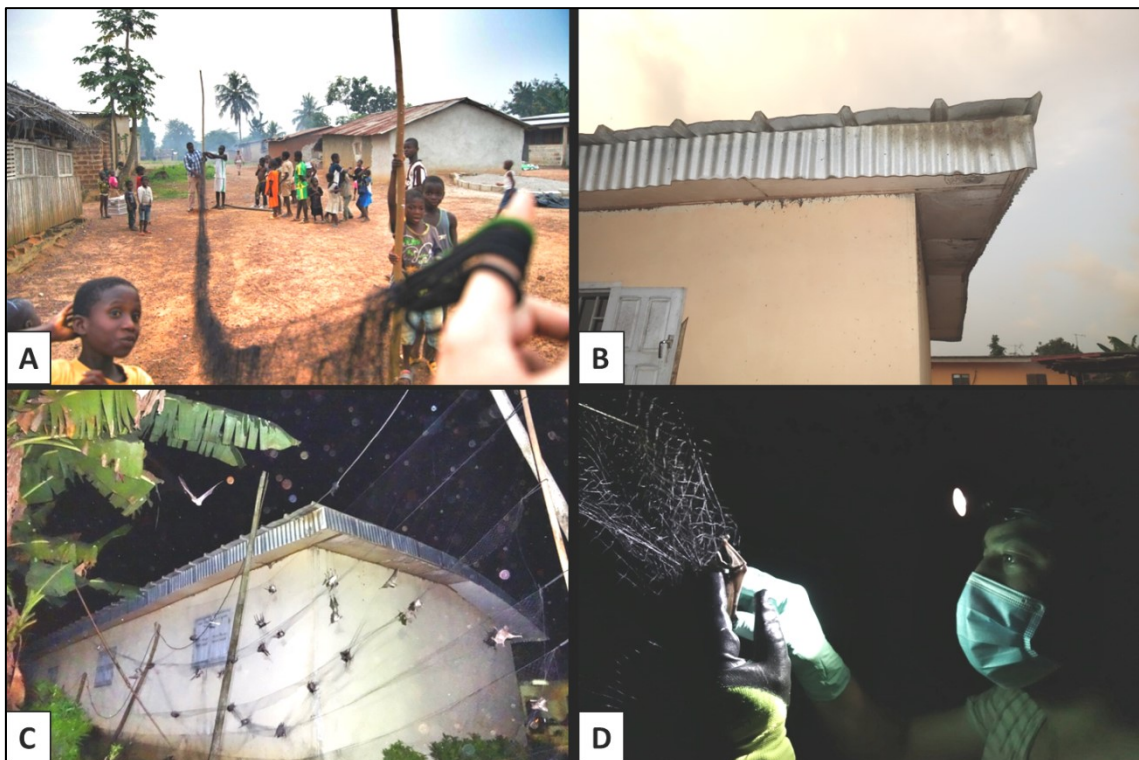
Anhang, Abbildung 1: Konstruktion der Fledermausvolieren an der Elfenbeinküste

A: Außenkäfig; B: Verschraubung der Volierenmodule; C: Hauptvoliere (rechts) und Quarantänevoliere (links).



Anhang, Abbildung 2: Fangen von Fledermäusen an der Elfenbeinküste

A: Aufstellen von Japannetzen zum Fledermausfang; B: Quartier der Fledermauskolonie im Dorf Koffikro; C und D: Fledermäuse der Art *M. condylurus* im Netz.



Anhang, Abbildung 3: Mehlwürmer als Nahrung für Fledermäuse in Gefangenschaft

A: Mehlwurmhaltung an der Elfenbeinküste; B: Obst, Haferflocken und Brot zur Versorgung der Mehlwürmer; C: Larve oder Mehlwurm (links), Puppe (mittig) und Mehlkäfer (rechts).



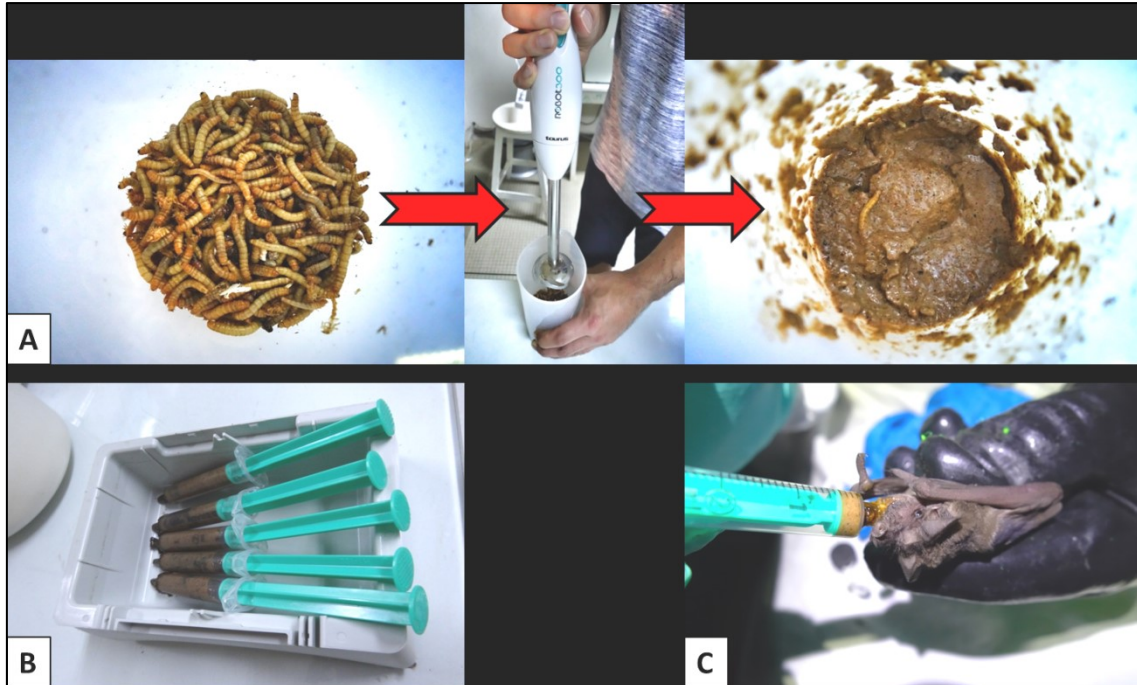
Anhang, Abbildung 4: Haltung und Fütterung von *M. condylurus*-Fledermäusen

A und B: Handfütterung von Fledermäusen mit Mehlwürmern; C: Fledermäuse in der Voliere während der Langzeithaltung an der Elfenbeinküste.



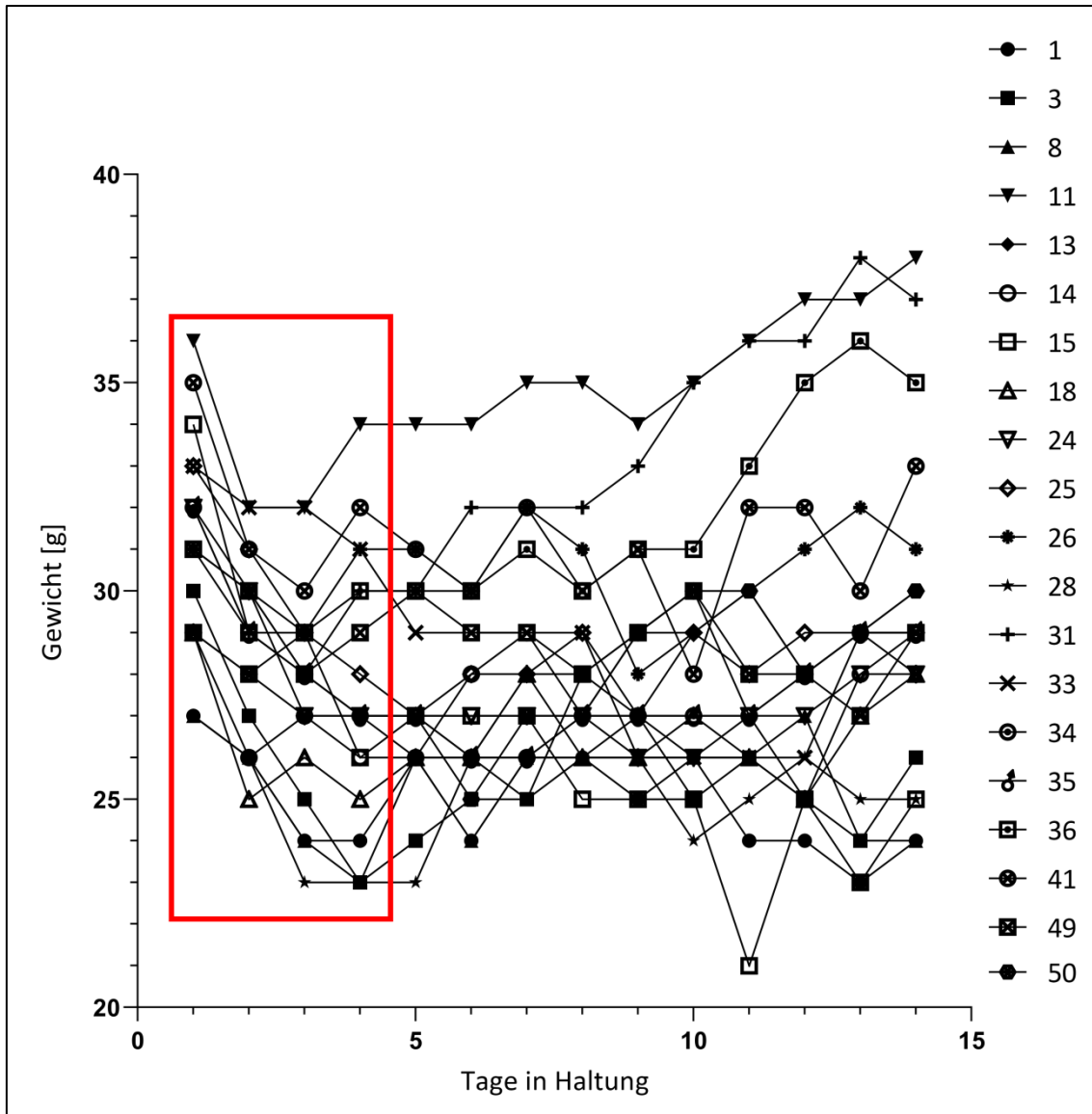
Anhang, Abbildung 5: Pürierte Mehlwürmer als Nahrung für die Fledermäuse in der Anfangsphase der Nahrungsumstellung

A: Herstellung von Mehlwurm-Püree; B: Vorbereitung von Spritzen (3 ml) für die Fütterung; C: Handfütterung einer Fledermaus mit Mehlwurm-Püree.



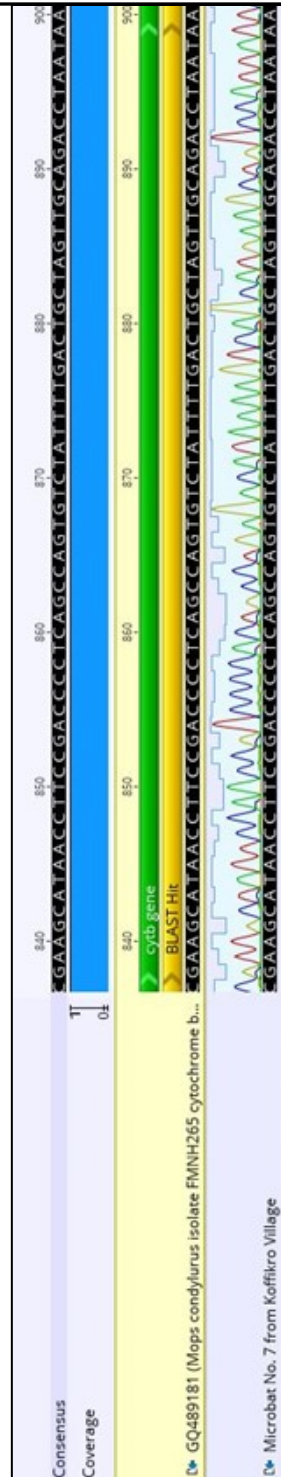
Anhang, Abbildung 6: Fledermausgewicht innerhalb der ersten 14 Tage in Gefangenschaft

In rot markiert: initialer Gewichtsverlust in den ersten vier Tagen bei Nahrungsumstellung auf Mehlwürmer.



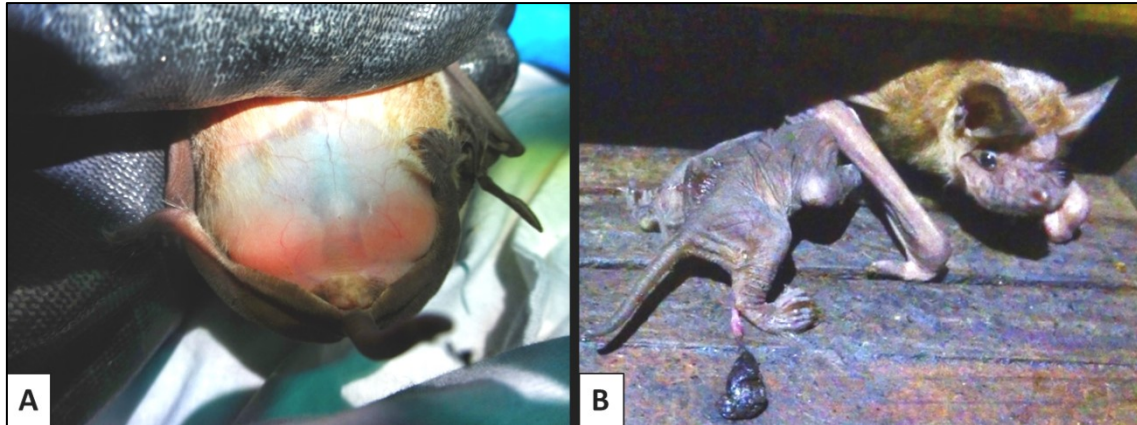
Anhang, Abbildung 7: Bestätigung der Fledermausspezies

Nach Amplifikation und Sequenzierung eines 241 bp großen Fragmentes auf dem *Cytochrom b*-Gen, wurde für jede gefangene Fledermaus die Spezies durch BLAST-Analyse bestätigt (hier exemplarisch für Fledermaus Nr. 7 gezeigt).



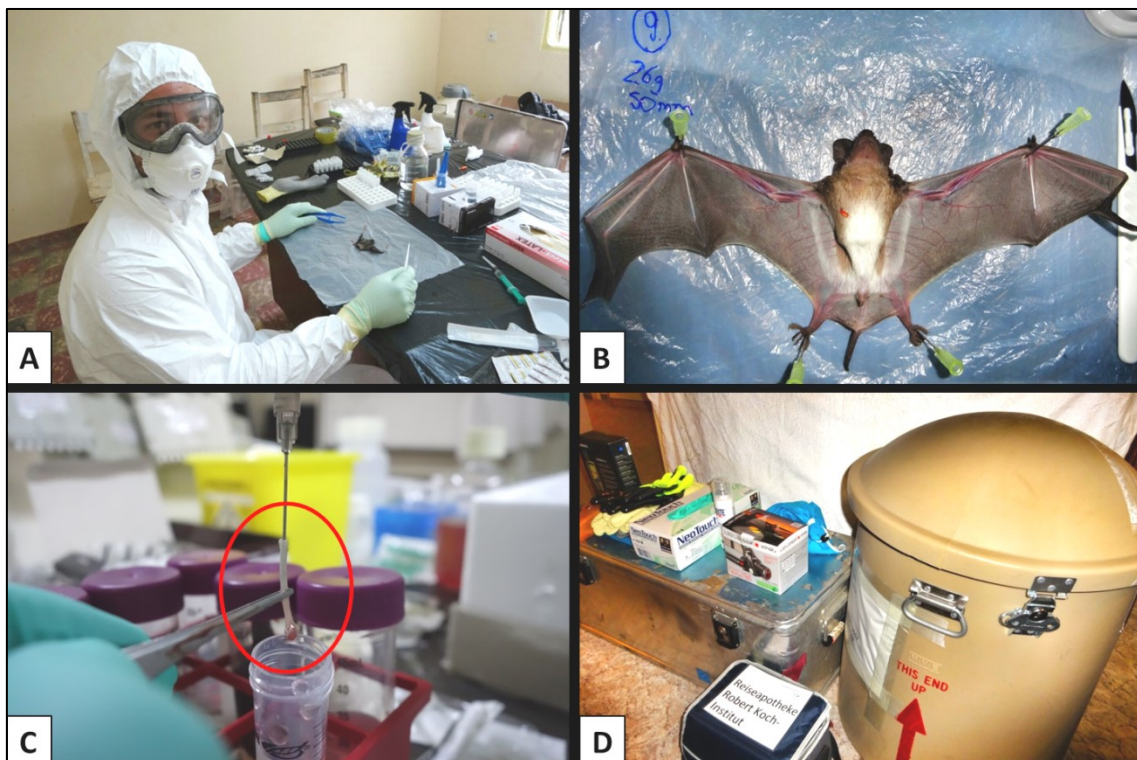
Anhang, Abbildung 8: Nachwuchs von Fledermäusen während der Langzeithaltung

A: Trächtige Fledermaus der Art *M. condylurus*; B: Fledermaus-Muttertier mit Nachwuchs am Tag nach der Geburt.



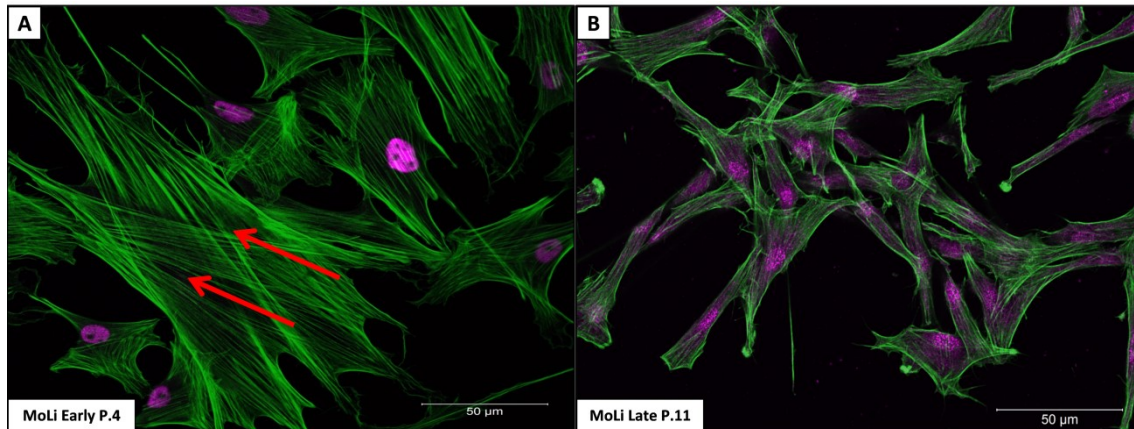
Anhang, Abbildung 9: Entnahme und Transport von Fledermausorganen von der Elfenbeinküste für die Etablierung von Primärzellkulturen

A und B: Nekropsie von Fledermäusen; C: Spülung des Humerus (Oberarmknochens, rote Ellipse) zur Gewinnung von Knochenmarkzellen; D: IATA *CryoShipper* für den Transport der Fledermausorgane nach Deutschland.



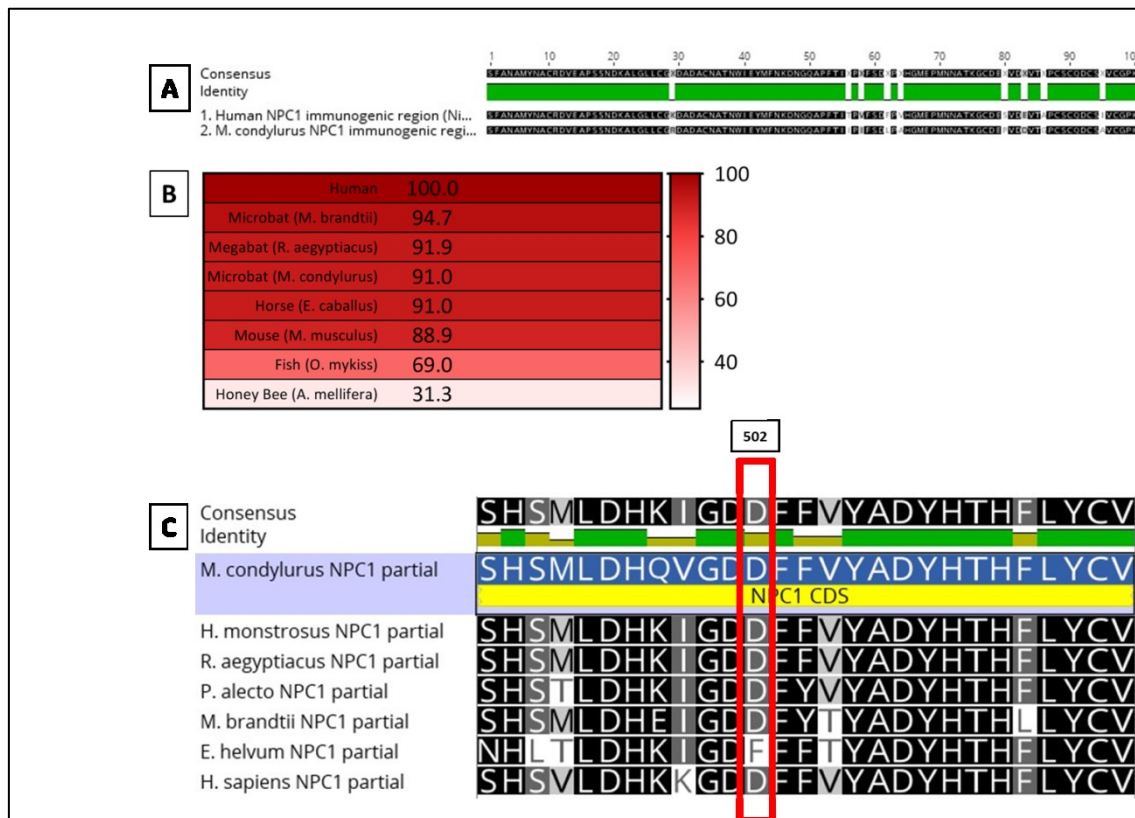
Anhang, Abbildung 10: Positive Transgenexpression (SV40T) in MoLi-Zelllinie zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Immortalisierung

Die positive Transgenexpression von SV40T (magenta) wurde durch konfokale Mikroskopie bestätigt. Zusätzlich wurde das Aktinzytoskelett angefärbt (grün). A (MoLi Early): Vier Passagen nach der Immortalisierung waren neben immortalisierten Zellen auch nicht-immortalisierte Primärzellen ohne SV40T-Expression zu erkennen (rote Pfeile). Weiteres Passagieren führte zu einem Verlust der Primärzellen. B (MoLi Late): Elf Passagen nach Immortalisierung waren ausschließlich SV40T-immortalisierte Zellen zu erkennen. A und B: 63 x.



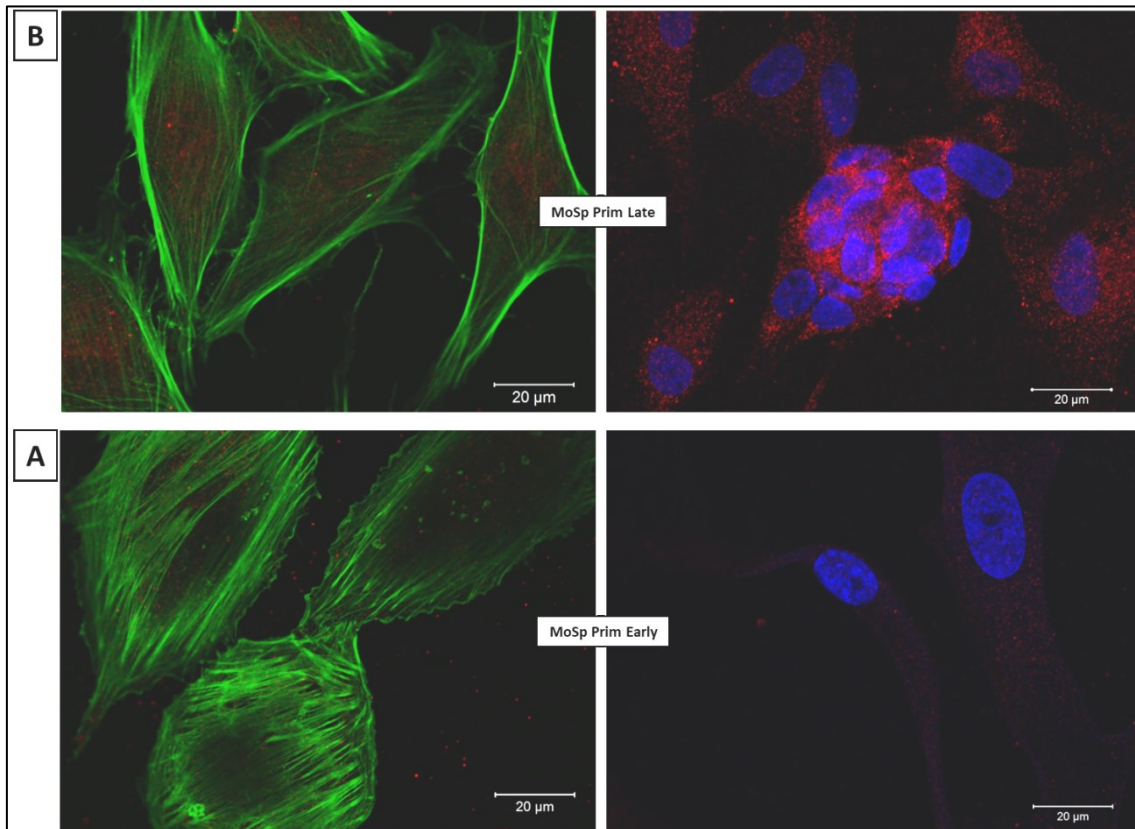
Anhang, Abbildung 11: Sequenzalignments von *M. condylurus* NPC1

A: *Alignment* der immunogenen Region (Aminosäuren 151-250) für den Maus anti-Human-NPC1-Antikörper (ab55706, abcam) von humanem (1) und *M. condylurus* NPC1 (2). B: NPC1-Sequenzhomologie (immunogene Region) zwischen verschiedenen Taxa. C: Multiple *Alignments* von NPC1-Partialsequenzen (Domäne C, Aminosäuren 491-517). Aminosäure 502 wurde durch eine rote Box hervorgehoben. Hochkonservierte Aminosäuren wurden in schwarz, weniger konservierte Aminosäuren in dunkelgrau und hellgrau dargestellt. Andere Sequenzen als *M. condylurus* NPC1 stammten aus NCBI-Datenbank oder von Ng et al. [180].



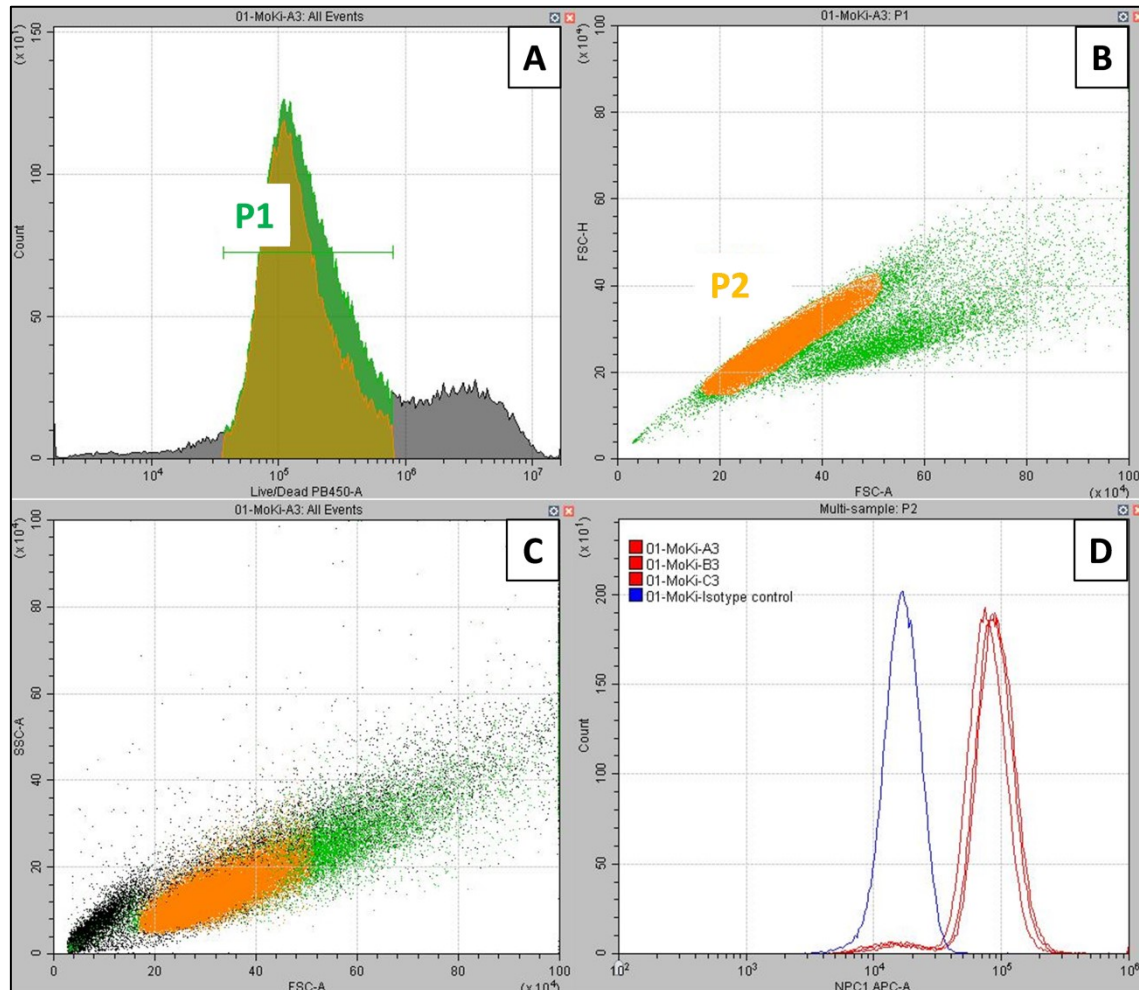
Anhang, Abbildung 12: Vergleich der NPC1-Rezeptor-Expressionslevel in MoSp Prim-Zellen mit unterschiedlicher Passagenzahl durch konfokale Mikroskopie

Linke Spalte: gefärbtes Aktinzytoskelett (grün); rechte Spalte: gefärbter NPC1-Rezeptor (rot), gefärbter Zellkern (blau). A: primäre Milzzellen in Passage 5 (MoSp Prim Early) mit niedriger NPC1-Rezeptor-Expression; B: Milzzellen in Passage 29 (MoSp Prim Late) mit hoher NPC1-Rezeptor-Expression. Vergrößerung A und B: 63 x.



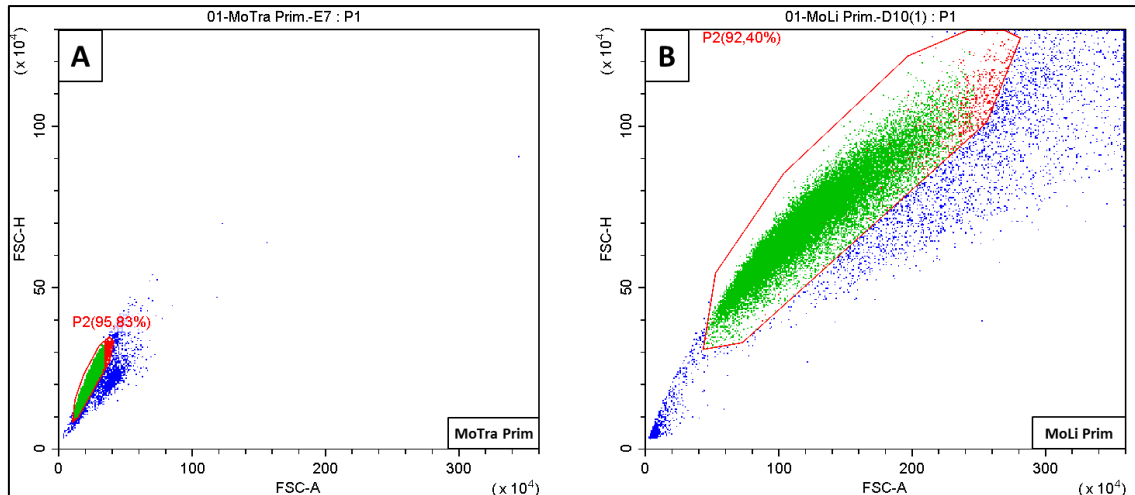
Anhang, Abbildung 13: Gatingstrategie bei der durchflusszytometrischen Messung der NPC1-Rezeptor-Expressionslevel (MoKi Referenz-Zelllinie)

A: Lebende Zellen (P1, grün); B: *Singlets* (P2, orange); C: Lebende *Singlets* (orange) in der gesamten MoKi-Zellpopulation; D: relative Fluoreszenz nach NPC1-Rezeptor-Färbung (MoKi-A3,B3,C3; rot), Isotypkontrolle (blau).



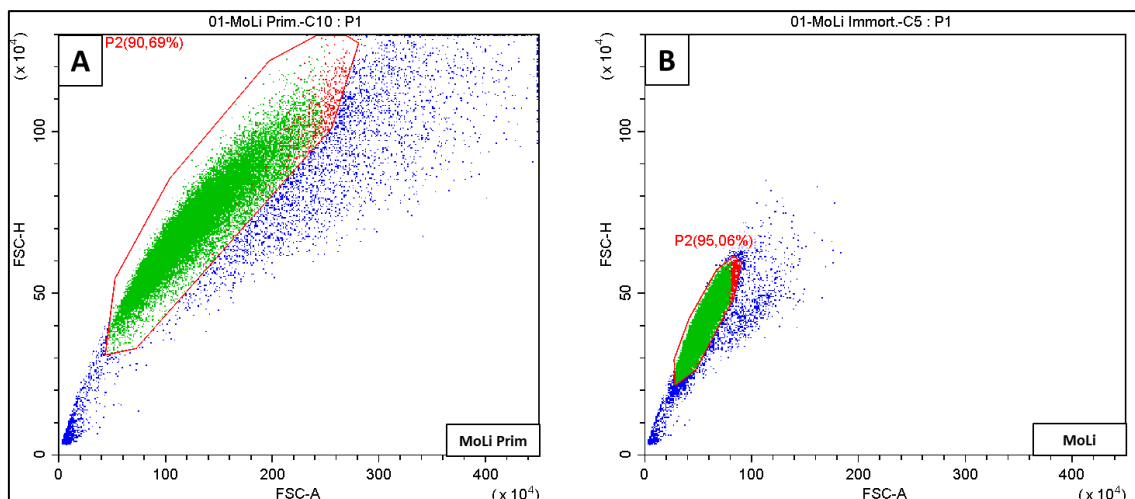
Anhang, Abbildung 14: Vergleich von homogenen und heterogenen Primärzellkulturen mit Durchflusszytometrie

A: homogene Primärzellkultur (MoTra Prim); B: heterogene Primärzellkultur (MoLi Prim) mit einer großen Vielfalt unterschiedlicher Zelltypen.



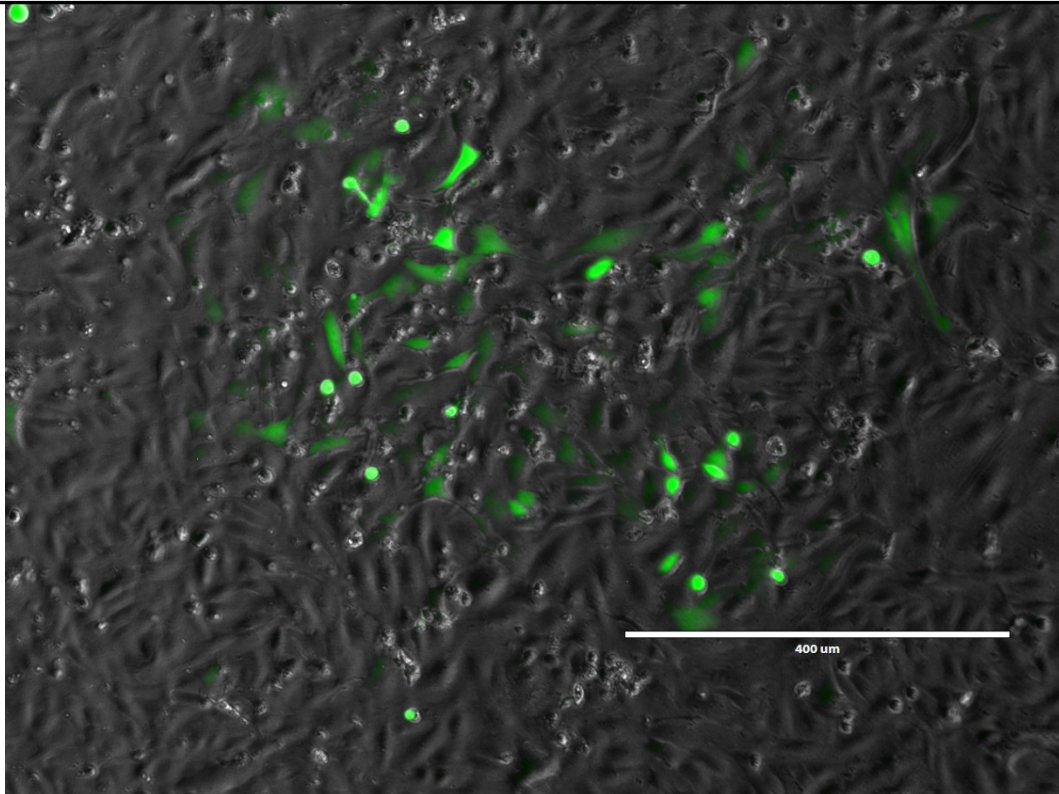
Anhang, Abbildung 15: Vergleich von primären und SV40T-immortalisierten Leberzellen mit Durchflusszytometrie

A: große Vielfalt an unterschiedlichen Zelltypen in Leberprimärzellkultur (MoLi Prim); B: SV40T-immortalisierte Leberzellen (MoLi). Immortalisierung und fortlaufendes Passagieren der Zellen führte zur Entstehung einer relativ homogenen Zellpopulation im Vergleich zur Leberprimärzellkultur.



Anhang, Abbildung 16: EBOV-GFP-infizierte MoLu Prim-Zellen 62 Tage nach initialer Infektion

In infizierten Zellen wurde GFP (grün) gebildet. Auch 62 Tage nach initialer Infektion war nur ein Teil der Zellen im Monolayer infiziert.

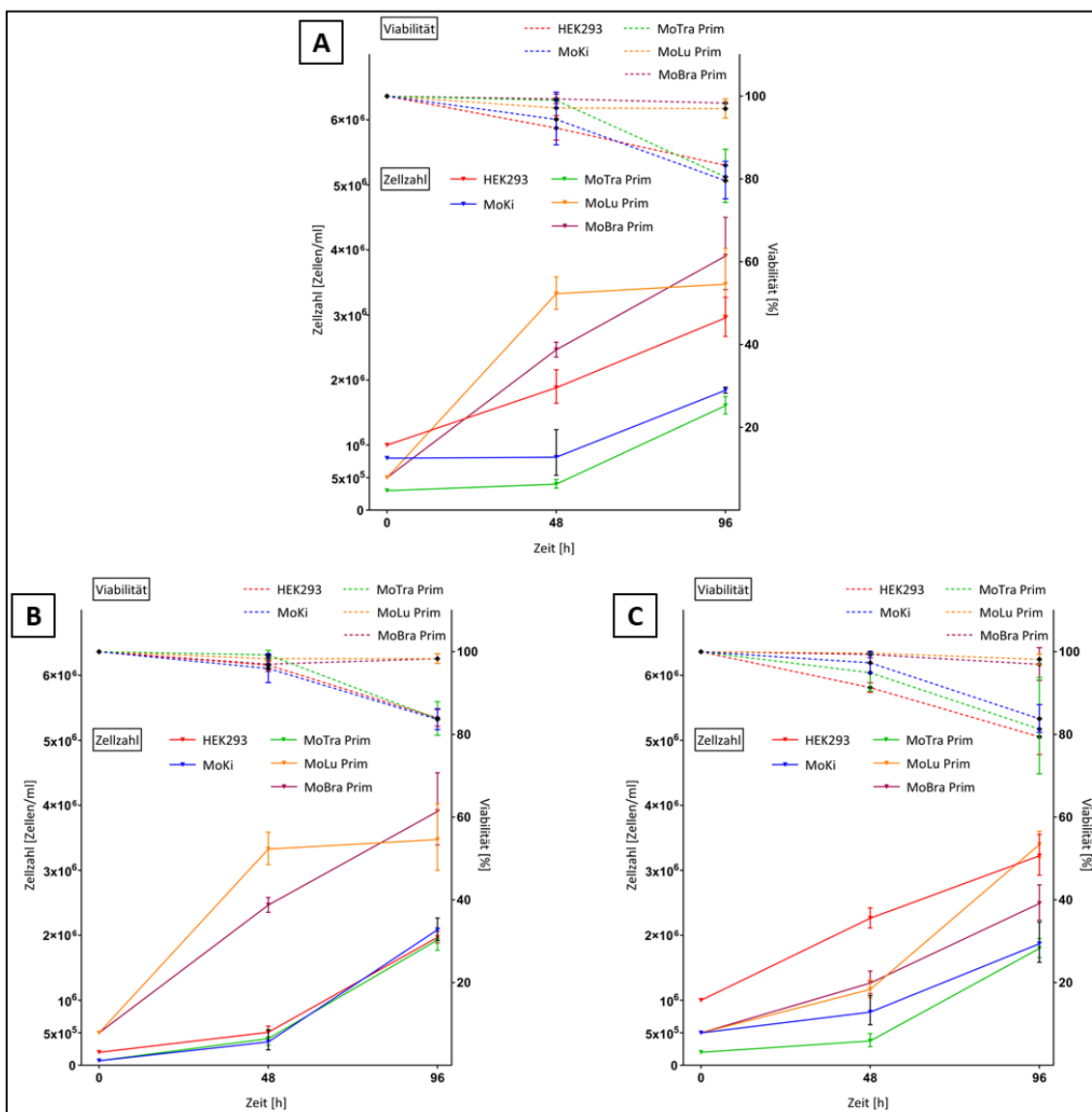


Anhang, Abbildung 17: Einbringen eines iButton Loggers (rot markiert) in das Quartier der Fledermauskolonie im Dorf Koffikro an der Elfenbeinküste



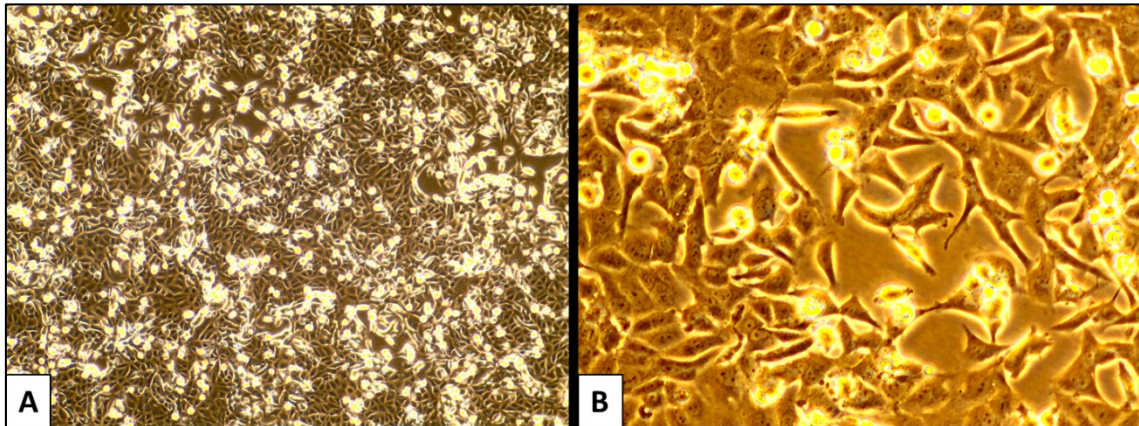
Anhang, Abbildung 18: Zellwachstum und Viabilität von Fledermaus- und humanen Zellen bei 27°C, 37°C und 42°C

HEK293-, MoKi-, MoTra Prim-, MoLu Prim- und MoBra Prim-Zellen wurden bei 27°C (A), 37°C (B) und 42°C (C) kultiviert. Nach 48 h und 96 h wurden drei Wells einer 6-well-Platte pro Zellkultur für die Darstellung des Zellwachstums ausgezählt (linke Y-Achse). Gleichzeitig wurde die Viabilität der Zellen bestimmt (rechte Y-Achse). Für alle getesteten Zellkulturen konnte bei allen Temperaturen Zellwachstum beobachtet werden und die Viabilität der Zellen lag nach 96 h zwischen 80-97 %.

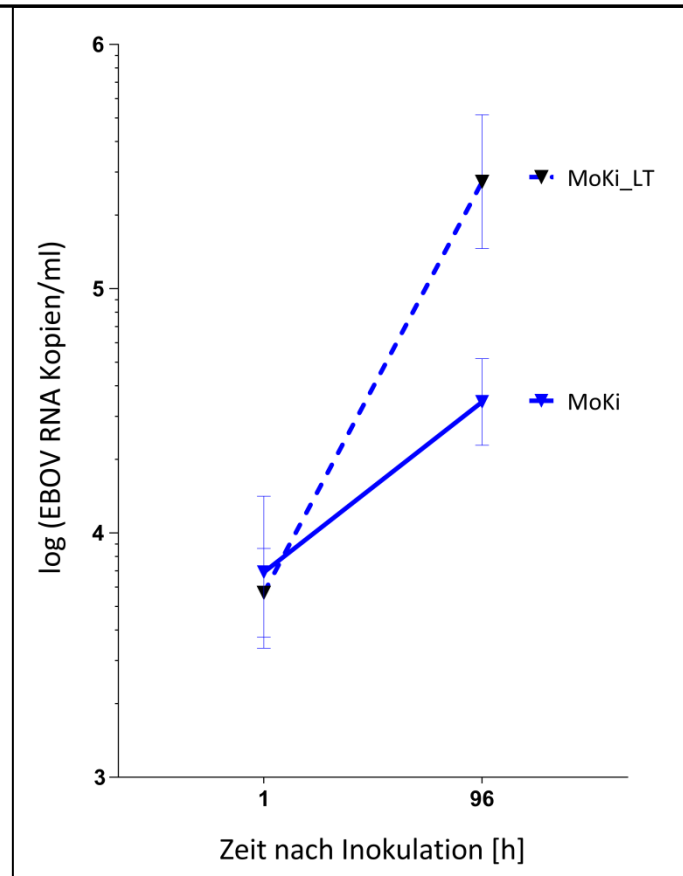


Anhang, Abbildung 19: Phasenkontrastmikroskopie von MoKi_LT-Zellen nach 147 Tagen bei 27°C

MoKi-Zellen wurden 147 Tage bei 27°C inkubiert. A: 10 x; B: 40 x.

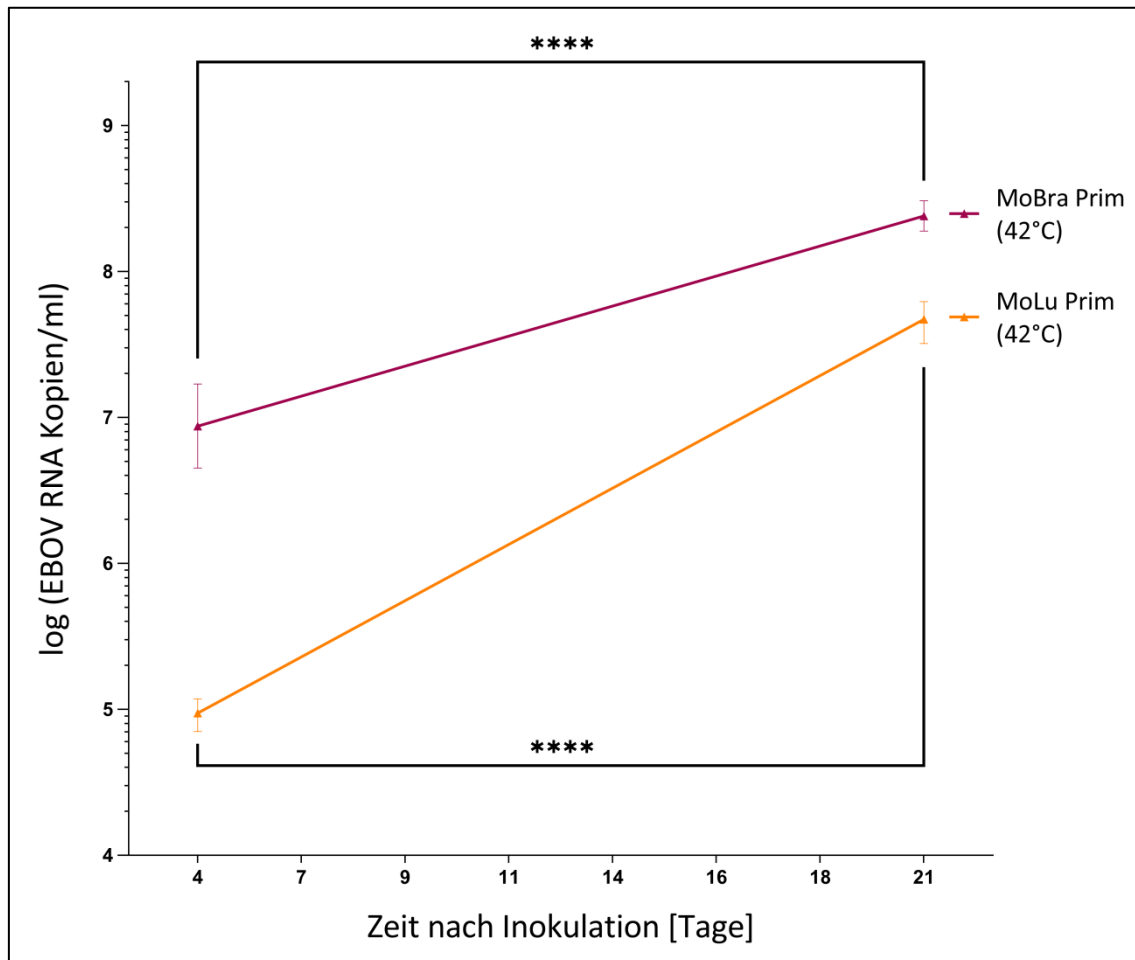
**Anhang, Abbildung 20: Vergleich der EBOV-Replikationskinetik in MoKi- und MoKi_LT-Zellen**

Kopienzahl viraler RNAs pro ml in Zellkulturüberständen. Geringfügig höhere EBOV-Replikationsrate in MoKi_LT- im Vergleich zu MoKi-Zellen nach 96 h Inkubation bei 27°C.



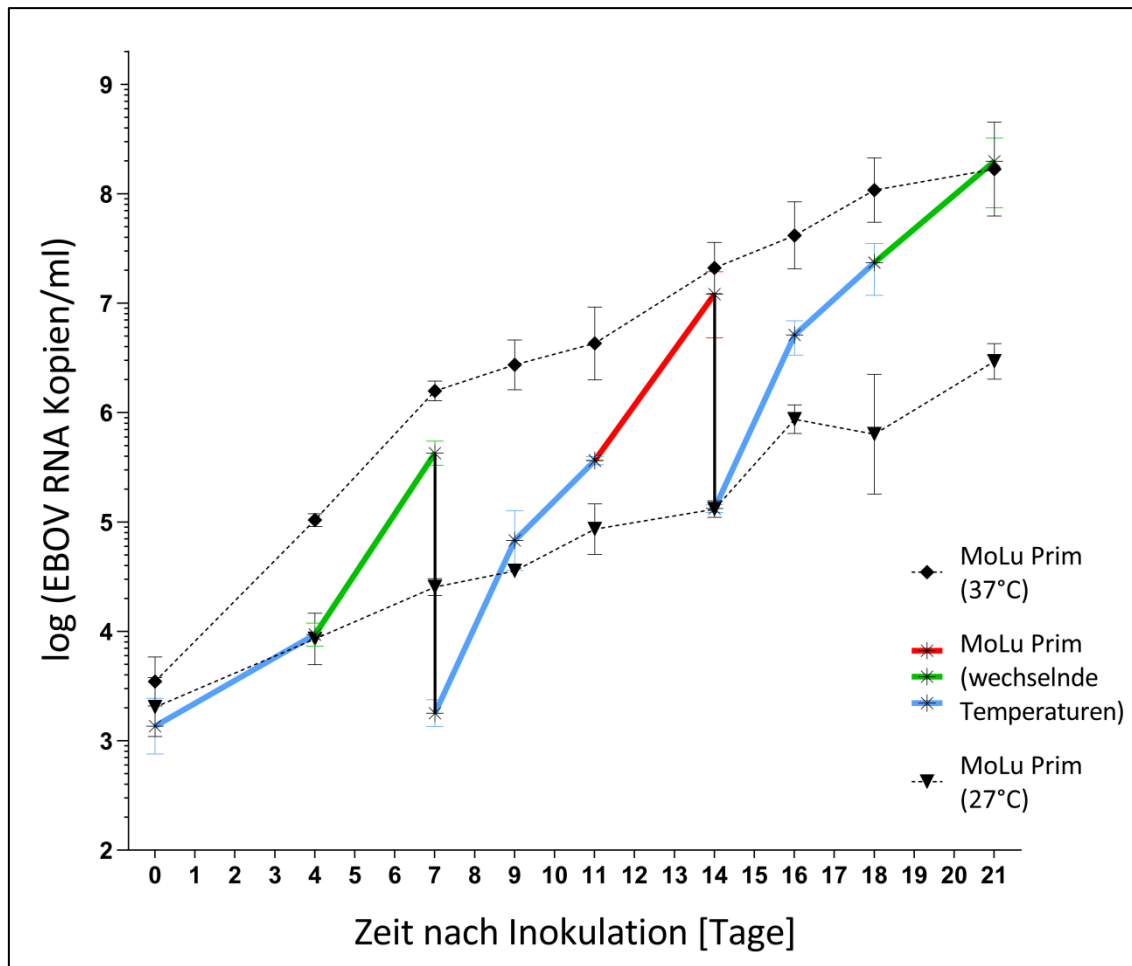
Anhang, Abbildung 21: EBOV-Replikationskinetik in MoLu Prim- und MoBra Prim-Zellen bei 42°C

Kopienzahl viraler RNAs pro ml in Zellkulturüberständen. MoLu Prim (orange), MoBra Prim (violett). Signifikante Virusreplikation in beiden *M. condylurus*-Primärzelltypen über 21 Tage bei 42°C; **** = $P < 0.0001$.



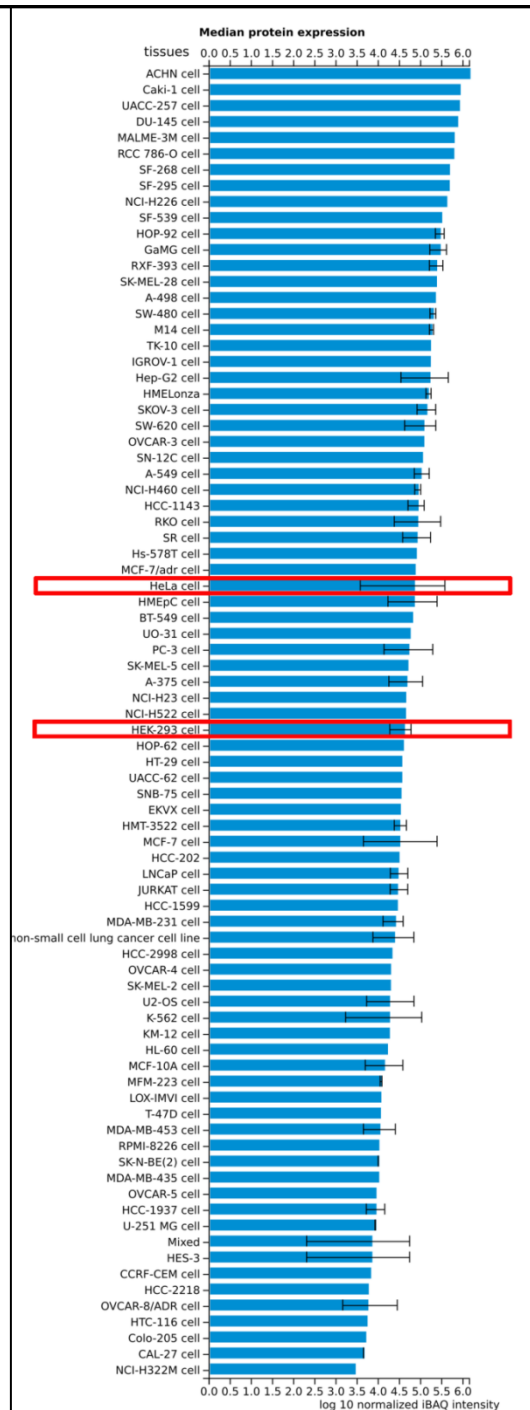
Anhang, Abbildung 22: EBOV-Replikationskinetik in MoLu Prim-Zellen bei wechselnden Inkubationstemperaturen

Kopienzahl viraler RNAs pro ml in Zellkulturüberständen. MoLu Prim-Zellen bei wechselnden Inkubationstemperaturen: 27°C (blau), 37°C (grün) und 42°C (rot). Dreimaliges Waschen mit PBS an Tag 7 und 14 (vertikale, schwarze Linie). Kontrollen (gestrichelte Linien): MoLu Prim-Zellen kontinuierlich über 21 Tage bei 27°C (Dreieck), bei 37°C (Raute).



Anhang, Abbildung 23: NPC1-Rezeptor-Expressionslevel in verschiedenen humanen Zelllinien

Die Menge an exprimiertem NPC1 in HEK293- und HeLa-Zellen (rote Boxen) ist geringer als in verschiedenen anderen humanen Zelllinien. Die Proteinexpression wurde dargestellt als log₁₀ normalisierte iBAQ-Intensität; die Daten sind verfügbar auf *Proteomics DB* [65].



7.2 Veröffentlichungen

A

Bokelmann M., Edenborough K.M., Hetzelt N., Kreher P., Lander A., Nitsche A., Vogel U., Feldmann H., Couacy-Hymann E. and Kurth A.

Utility of primary cells to examine NPC1 receptor expression in Mops condylurus, a potential Ebola virus reservoir. PLoS Negl Trop Dis. 2020;14(1):e0007952. Epub 2020/01/22. doi: 10.1371/journal.pntd.0007952. PubMed PMID: 31961874.

B

Edenborough K.M., **Bokelmann M.**, Lander A., Couacy-Hymann E., Lechner J., Drechsel O., Renard B., Radonić, A., Feldmann H., Kurth A. and Prescott J.

Dendritic cells generated from Mops condylurus, a likely Filovirus reservoir host, are susceptible to and activated by Zaire ebolavirus infection. Front Immunol. 2019;10(2414). doi: 10.3389/fimmu.2019.02414.

C

Edenborough K.M., Mu A., Muhldorfer K., Lechner J., Lander A., **Bokelmann M.**, Couacy-Hymann, E., Radonic, A. and Kurth, A.

Microbiomes in the insectivorous bat species Mops condylurus rapidly converge in captivity. PLoS One. 2020;15(3):e0223629. Epub 2020/03/21. doi: 10.1371/journal.pone.0223629. PubMed PMID: 32196505; PubMed Central PMCID: PMCPMC7083271

7.3 Vorträge

- **Institut Pasteur, Seoul, Südkorea**
„Current Research in the Field of Ebolaviruses and Bats“
Invited Speaker (2018)
- **HKU-Pasteur Research Pole, Hongkong**
„Studying Factors for Ebola Virus Entry in a Potential Reservoir Host“
Invited Speaker (2018)

7.4 Preise und Stipendium

- **HKU-Pasteur Research Pole, Hongkong**
Best Student Award (2016)
1. Preis beim *„Virology Course: Bats and Viruses“*
- **Elsa-Neumann-Stipendium des Landes Berlin**
Promotionsstipendium (2018-2020)

7.5 Konferenzen

- **Annual Meeting of the Society for Virology**
Würzburg (2018) und Düsseldorf (2019)
- **International Filovirus Symposium**
Marburg (2017)
- **International Berlin Bat Meeting**
Berlin (2017)
- **National Symposium on Zoonosis Research**
Berlin (2016, 2017, 2018, 2019)
- **International Scientific Symposium on Biomarkers**
Paris (2016)

8 Danksagung

Ganz besonders danken möchte ich Dr. Andreas Kurth für die exzellente Betreuung, das spannende und einzigartige Promotionsthema, für die stets “offene Tür”, die tollen fachlichen Diskussionen, die Hilfsbereitschaft, den unermüdlichen Einsatz für das Projekt, die mehrmalige Unterstützung vor Ort in Afrika, für die Geduld, Zeit und für die enorme Unterstützung bei Publikationen und Anträgen. Vielen herzlichen Dank auch an Prof. Dr. Detlev Krüger für die Betreuung von Seiten der Universität und die jahrelange Unterstützung meiner wissenschaftlichen Laufbahn schon während meines Studiums und der Diplomarbeit. Ebenfalls vielen Dank an Prof. Dr. Andreas Nitsche für die wertvollen Ratschläge und Anregungen für diese Dissertation.

Ich danke allen Kollegen bei ZBS 5 für die wunderbare Zusammenarbeit und die unvergessliche Zeit. Vielen Dank an Dr. Joseph Prescott für die unzähligen Diskussionen und fachlichen Anregungen vor und nach Feierabend und die Mitwirkung bei zahlreichen Experimenten im S4-Labor. Ich danke desweiteren Dr. Kathryn Edenborough für ihren Einsatz bei der Unterstützung meines Projektes, die exzellenten fachlichen Diskussionen und ihre Expertise insbesondere bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen. Für sein Engagement bezüglich aller Fragen der Arbeitssicherheit in Afrika und im S4-Labor danke ich ganz herzlich Frank Siejak. Besonders danken möchte ich Uwe Vogel, meinem häufigsten S4-Buddy, der mich mit größtem Einsatz bei allen mikroskopischen Untersuchungen und bei allen Infektionsexperimenten im Hochsicherheitslabor unterstützt hat. Ebenfalls ein besonderer Dank gilt Angelika Lander, die an vielen Experimenten in dieser Arbeit mitgewirkt und mich in zahlreiche Methoden eingearbeitet hat. Vielen Dank für die Überstunden bei den Zellkulturarbeiten und für die tatkräftige Unterstützung bei der Aufarbeitung der Proben von der Elfenbeinküste. Vielen Dank an Petra Kreher für die umfangreiche Mitarbeit bei der Etablierung der Zellkulturen. Ein besonderer Dank auch an Dr. Gudrun Wibbelt, die mich an die Nekropsien von Fledermäusen herangeführt und uns eine europäische Fledermaus für die Etablierung von Zellkulturen bereitgestellt hat.

Unserem Kooperationspartner an der Elfenbeinküste, Prof. Emmanuel Couacy-Hymann, möchte ich für die hervorragende Zusammenarbeit und die Möglichkeit danken, dass die Langzeitstudie mit den Fledermäusen am LANADA-Institut durchgeführt werden konnte. Nicole Hetzelt, Katharina Hansen-Kant und Norman Kirchoff danke ich für ihren wochenlangen Einsatz in Afrika, die tatkräftige Mithilfe bei der Logistik und beim Proben- und Mehlwurmtransport für das "Fledermaus-Afrika-Projekt". Danke auch an unsere beiden Tierpfleger an der Elfenbeinküste, Romeo und Assamoi, die sich fast ein Jahr lang täglich um die Fledermäuse gekümmert haben. Ich danke PD Dr. Fabian Leendertz für all die Unterstützung an der Elfenbeinküste und für die Möglichkeit, dass ich einen Feldeinsatz nach Taï begleiten durfte: Die gewonnene Felderfahrung beim Fangen und den Nekropsien bei Fledermäusen haben mir für meine Arbeit sehr geholfen. Danke auch Leonce Kouadio für die ausgezeichnete Zusammenarbeit an der Elfenbeinküste.

Ein großer Dank auch an Dr. Aleksandar Radonic für seine Expertise bei der Sequenzierung der Proben und ein großer Dank an Johanna Lechner, Dr. Sandra Appelt und Dr. Oliver Drechsel für die sehr umfangreiche bioinformatische Analyse der Daten.

Ich bedanke mich für die finanzielle Förderung durch das Elsa-Neumann-Stipendium des Landes Berlin, welches mir auch meine Aufenthalte in Hong Kong und Südkorea ermöglichte.

Meiner Freundin Nicole Schröer möchte ich für den liebevollen Rückhalt, das Verständnis und ihre Geduld während dieser Doktorarbeit danken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, Dieter und Sunja Bokelmann, die stets an mich geglaubt und mich unentwegt und bedingungslos mein ganzes Leben lang unterstützt haben. Danke! Ohne euch wäre das alles nicht möglich gewesen.

9 Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfen und Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Ich habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze keinen entsprechenden Doktorgrad.

Ich erkläre, dass ich die Dissertation oder Teile davon nicht bereits bei einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung eingereicht habe und dass sie dort weder angenommen noch abgelehnt wurde.

Ich erkläre die Kenntnisnahme der dem Verfahren zugrunde liegenden Promotionsordnung der Lebenswissenschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin vom 5. März 2015.

Weiterhin erkläre ich, dass keine Zusammenarbeit mit gewerblichen Promotionsbearbeiterinnen/Promotionsberatern stattgefunden hat und dass die Grundsätze der Humboldt-Universität zu Berlin zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis eingehalten wurden.

Berlin, den 30. September 2020

Marcel Bokelmann